

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von ATP-Synthasen und OxPhos-Komplexen in Tieren und Pflanzen



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie

der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Sven-Hendric Marx

aus Offenbach am Main

Referent: Prof. Dr. Norbert A. Dencher

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 21. April 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2016

Darmstadt 2016

D17



Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Norbert A. Dencher in der Zeit von Februar 2012 bis April 2016 im Fachbereich Chemie am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie an der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen

A. M. Balakrishna, H. Seelert, S. H. Marx, N. A. Dencher, G. Grüber

Crystallographic structure of the turbine c-ring from spinach chloroplast F-ATP synthase

Biosci Report, 2014

Manuskript eingereicht:

E. Round, V. Borshchevskiy, V. Polovinkin, V. Shevchenko, A. Remeeva, I. Gushchin,

A. Ishchenko, A. Kuklin, S.-H. Marx, N. A. Dencher, G. Büldt, V. Gordeliy

Membrane protein crystallization: breaking the detergent paradigm

Nature Chemical Biology

K. Kuter, M. Kratochwil, S.-H. Marx, S. Hartwig, S. Lehr, M. D. Sugawa, K. Ossowska,

N. A. Dencher

Proteomic native DIGE analysis of mitochondria from substantia nigra and striatum during neuronal degeneration and its compensation in an animal model of early Parkinson's disease

Archives of Physiology and Biochemistry

Manuskript in Vorbereitung:

M. Kratochwil, S.-H. Marx, V. Decker, S. Hartwig, K. Kuter, L. Cavlovic,

K. Ossowska, S. Lehr, N. A. Dencher

Identification of mitochondrial proteins from hearts of five different mammals, from kidney of one mammal, from five different rat brain areas and two cell culture samples, all separated by 2D-BN/SDS PAGE.

geplant in: J. Proteome research

Posterpräsentationen

Sven-Hendric Marx, Olga Ankudin, Asha Manikkoth Balakrishna, Holger Seelert, Gerhard Grüber, Norbert A. Dencher

Influence of external factors on mitochondrial and chloroplast proteins of Chlamydomonas reinhardtii and characterisation of the chloroplast-ATP-synthase from Spinacea oleracea

64. Mosbacher Kolloquium - "Membranes in Motion" Deutsche Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 4. bis 6. April 2013, Mosbach (Baden)

Sven-Hendric Marx, Olga Ankudin, Asha Manikkoth Balakrishna, Holger Seelert, Gerhard Grüber, Norbert A. Dencher

Influence of external factors on mitochondrial and chloroplast proteins of Chlamydomonas reinhardtii and characterisation of the chloroplast-ATP-synthase from Spinacea oleracea


Molecular Life Sciences 2013, Internationales Symposium der Deutschen Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 3. bis 6. Oktober 2013, Frankfurt am Main

Danksagung

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. Norbert A. Dencher, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Betreuung meiner Arbeit und der damit verbundenen Unterstützung in Form von anregenden Diskussionen und der Vermittlung von fachlichen Kooperationen.
- Prof. Dr. Gerhard Thiel, für die Übernahme des Korreferats.
- Prof. Dr. Gerd Buntkowsky und Prof. Dr. Bodo Laube dafür, dass sie die Rolle der Fachprüfer übernehmen.
- Dr. Katarzyna Kuter für die Bereitstellung von Gewebeproben und die stets interessanten Diskussionen.
- Dr. Stefan Lehr, Dr. Sonja Hartwig und den netten und hilfsbreiten Mitarbeitern des Deutschen Diabetes Zentrums, für die Analyse der Proben mit MALDI MS/MS und die phantastischen Rainbow Workshops, in denen wir nie Hunger leider mussten.
- Prof. Dr. Grüber, Prof. Dr. Gordeliy und Ihren Arbeitsgruppen für die fruchtbaren wissenschaftlichen Kooperationen bei der Kristallisation der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat, die zu den gemeinsamen Veröffentlichungen führten.
- M. Sc. Victoria Petermann und M. Sc. Olga Ankudin, die mit mir im Rahmen Ihrer Masterarbeiten an der Isolierung und Analyse von mitochondrialen Proteinen aus Säugetieren gearbeitet haben.
- M. Sc. Stefanie Ascher (geb. Kemski) und B. Sc. Daniela Goedderz, die mich im Rahmen Ihrer Abschlussarbeiten bei der Kultivierung der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* unterstützt haben.
- Sabine Reinhold und Michaela Fröhlich, bei administrativen Aufgaben und interessanten Unterhaltungen.
- Christine Schröpfer, bei der Unterstützung in Praktika und für die Bereitstellung von Gewebeproben aus Reh.
- Simone Bartl-Zimmermann, für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Betreuung des Grundpraktikums und die stets netten Unterhaltungen.
- Dr. Holger Seelert, für die hilfreichen Antworten zu Fragen der ATP-Synthase.
- Dr. Lidija Cavlovic, Dipl.-Biochem. Victoria Decker, M. Sc. Tamara Dzinic, Dr. Michael Muschol und Dr. Sandra Thilmany, für ein ganz tolles Mitarbeiterklima in der Arbeitsgruppe, die vielen Gespräche, interessanten Diskussionen und besonders die erholsamen Eispausen im Sommer.
- Allen anderen Mitgliedern der AG Dencher, die ich jetzt vergessen habe.
- Meinen Freunden Dr. Thorsten Heinlein, M. A. Christoph Hein, Dr. Monika Hofmann und Dr. Heiko Hofmann.
- Meiner Freundin Manu (Dr. Manuela Kratochwil), für die Unterstützung und Motivation während meiner Promotion und dafür, dass sie sie mich oft unerwartet zum Schmunzeln bringt.
- Meiner Mutter, ohne sie hätte ich es niemals so weit geschafft, und den Rest meiner Familie, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.





„Die besten Dinge im Leben sind nicht die, die man für Geld bekommt.“

Albert Einstein



Inhaltsverzeichnis

Publikationen	iii
Posterpräsentationen	iv
Danksagung	v
1 Zusammenfassung.....	1
1 Summary	5
2 Einleitung	9
2.1 Mitochondrien	9
2.2 ATP-Synthase	11
2.2.1 Aufbau und Funktion	11
2.2.2 Rolle der Dimere.....	15
2.3 Motivation	18
3 Materialien.....	19
3.1 Chemikalien.....	19
3.2 Antikörper	22
3.3 Geräte.....	23
3.4 Verbrauchsmaterialien	25
3.5 Software	26
3.6 Biologische Proben aus tierischem Gewebe.....	27
3.6.1 Herzproben aus Rind.....	27
3.6.2 Herzproben aus Maus	27
3.6.3 Herzproben aus Ratte	27
3.6.4 Herzproben aus Schwein	28
3.6.5 Herzproben aus Wildschwein.....	28
3.6.6 Herz- und Nierenprobe aus Reh	28
3.6.7 Aufstellung der verwendeten Proben	28
3.7 Die Grünalge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	30
4 Methoden.....	31
4.1 Isolierung von Mitochondrien aus tierischem Gewebe.....	31
4.1.1 Isolierung von Mitochondrien aus Herzmuskelgewebe A	31
4.1.2 Isolierung von Mitochondrien aus Herzmuskelgewebe B	32
4.1.3 Isolierung von Mitochondrien aus Rehnieren	32
4.2 Anzucht von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> -Kulturen	33
4.2.1 Aufschluss der Zellen und Isolierung der Chloroplasten und Mitochondrien	34
4.3 Isolierung der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat.....	36
4.4 Proteinbestimmung.....	37
4.4.1 Bradford	37

4.4.2	Pyrogallolrot	37
4.4.3	Lowry	38
4.5	Solubilisierung von Membranproteinen	40
4.5.1	Solubilisierung von Mitochondrien aus tierischem Gewebe	40
4.5.2	Solubilisierung von Mitochondrien aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	41
4.6	Gelelektrophoretische Trennverfahren	42
4.6.1	Blau-native Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	42
4.6.2	Farblos-native Gelelektrophorese (CN-PAGE).....	45
4.6.3	Zweidimensionale Tricin-SDS-PAGE	47
4.6.4	Proteinmassenstandards	49
4.7	Färbemethoden	50
4.7.1	Coomassie-Färbung	50
4.7.2	Silber-Färbung	50
4.7.3	Sypro® Ruby-Färbung	51
4.8	In-Gel Aktivitätstest.....	52
4.8.1	In-Gel Aktivitätstest für Komplex I	53
4.8.2	In-Gel Aktivitätstest für Komplex IV	54
4.8.3	In-Gel Aktivitätstest für Komplex V	55
4.9	Western Blot	56
4.9.1	Regeneration der Membran.....	58
4.9.2	Verwendete Antikörper	58
4.9.3	Proteinmassenstandard für 2-D Western Blots	59
4.10	Peptide Mass Fingerprint.....	59
4.10.1	Messung	60
4.11	Quantifizierung von Proteinen	61
4.11.1	Quantifizierung von Proteinspots in 2D-Gelen	61
4.11.2	Quantifizierung von In-Gel Aktivitätstests (BN-Gele).....	62
4.11.3	Quantifizierung von In-Gel Aktivitätstests (CN-Gele)	63
4.12	Statistik	64
5	Ergebnisse und Diskussion.....	65
5.1	Charakterisierung von OxPhos-Komplexen aus tierischem Gewebe	65
5.1.1	Isolierung der Mitochondrien	65
5.1.2	Zuordnung von Proteinbanden in BN-Gelen	66
5.1.3	Quantitativer In-Gel Aktivitätstests für Komplex I und IV	76
5.1.4	Identifizierung von Proteinen in 2-D BN/SDS-Gelen	96
5.1.5	Quantitative Analyse des mitochondrialen Proteoms in 2-D BN/SDS-Gelen	121
5.1.6	Quantitativer In-Gel Hydrolyse-Aktivitätstest für Komplex V	162
5.2	Charakterisierung von Protein-Komplexen in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	183
5.2.1	Isolierung der Mitochondrien	183
5.2.2	Zuordnung der Proteinbanden von <i>C. reinhardtii</i> in BN-Gelen.....	184
5.2.3	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest für Komplex I und IV	189
5.2.4	Identifizierung von Proteinen in 2-D BN/SDS-Gelen	196
5.3	Strukturelle Untersuchungen der Chloroplasten-ATP-Synthase	202
5.3.1	Struktur des c ₁₄ -Zylinders (Kristallisation mittels Dampfdiffusionsverfahren).....	202
5.3.2	Membranproteinkristallisation: "Breaking the detergent paradigm".....	211

6	Abkürzungsverzeichnis	215
7	Literaturverzeichnis	218
8	Anhang	233



1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden ATP-Synthasen, OxPhos-Komplexe und Superkomplexe in Mitochondrien von Säugetieren und der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* funktionell analysiert und die Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat (*Spinacia oleracea*) strukturell charakterisiert.

Für die Untersuchung der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung (OxPhos-Komplexe) von Säugetieren wurden Mitochondrien aus Herzgewebe von Rind, Schwein, Wildschwein, Reh, Maus, Ratte (Wistar und Fischer) und aus Nierengewebe von Reh isoliert. Die Enzymkomplexe wurden mit dem milden Detergens Digitonin aus der Lipidmembran gelöst (solubilisiert) und mittels einer blau-nativen Gelelektrophorese (BN-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die enzymatische Aktivität und die dreidimensionale Struktur der Proteine ebenso wie Protein-Protein Wechselwirkungen erhalten bleiben. Eine Analyse der Atmungskettenkomplexe erfolgte durch In-Gel Aktivitätstests. Bei diesen Tests katalysiert der enzymatisch aktive Proteinkomplex die Bildung eines farbigen Präzipitats, dass auf der jeweiligen Gelbande detektiert werden kann. Bei den OxPhos-Komplexen aus isolierten Rinderherzmitochondrien war wie in vorherigen Arbeiten von Schäfer *et al.*^[1, 2] zu beobachten, dass sich die Komplexe I, III₂ und IV zu übergeordneten Strukturen, den sogenannten Superkomplexen (SC), zusammenlagern. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei Mitochondrien aus Schwein-, Wildschwein-, Reh-, Mäuse-, Rattenherz und Rehnieren die Superkomplexe III₂IV₁, I₁IV₂, I₁III₂ (a), I₁III₂IV₁ (b), I₁III₂IV₂ (c) und I₁III₂IV₃ (d) auftreten. Anhand der Intensität der Coomassie-gefärbten Banden und des gebildeten Präzipitats war zu erkennen, dass Komplex I hauptsächlich in Form von Superkomplexen gebunden ist und Komplex IV zu einem großen Teil als individueller Komplex vorliegt. Aus diesen In-Gel Aktivitätstests wurden mit der Software Delta 2D die relativen spezifischen Aktivitäten der Komplexe I und IV in dem BN-Gel ermittelt. Bei allen untersuchten Säugetierproben besaßen die Superkomplexe c und d für Komplex I die höchste spezifische Aktivität. Der Vergleich zwischen der spezifischen Aktivität des individuellen Komplexes I und dieser Superkomplexe zeigte, dass bei Rind, Schwein, Wildschwein und Reh die Aktivitäten im SC um den Faktor 2,3 gesteigert waren. Bei Maus und Ratte führte eine Assemblierung zu Superkomplexen bei I₁III₂IV₂ (c) zu einer Zunahme der Aktivität um den Faktor 3,4 und bei I₁III₂IV₃ (d) um den Faktor 3,6. Ein deutlicher Anstieg der Aktivität im Vergleich zum individuellen Komplex I war für Superkomplex c (Faktor 12,5) und Superkomplex d (Faktor 11,6) aus Rehnieren zu beobachten. Bei den Komplex IV-Aktivitätstests besaß bei allen Säugetierproben der individuelle Komplex IV die mit Abstand niedrigste Aktivität. Die Superkomplexe b und c zeigten bei Rind, Schwein, Wildschwein, Reh und Ratte die höchste spezifische Aktivität, bei Maus traf dies nur auf Superkomplex b zu. Diese deutliche Steigerung der Aktivität stellte sich im Vergleich zu dem individuellen Komplex IV wie folgt dar: Bei Herzmitochondrien aus Rind, Schwein, Wildschwein, Reh und Maus für Superkomplex b eine Zunahme um den Faktor 8,3 und für Superkomplex c um den Faktor 8,0 (ohne Maus). Bei den Rattenherzmitochondrien ist I₁III₂IV₁ (b) um den Faktor 11,6 und I₁III₂IV₂ (c) um den Faktor

14,02 aktiver. Bei den Solubilisaten aus Rehnere zeigte sich ebenfalls eine Steigerung der Aktivität für Superkomplex b (Faktor 4,2) und Superkomplex c (Faktor 4,8).

Mit Hilfe von Antikörpern gegen die Komplexe I, III, IV und V konnten in 1-D Western Blots von blau-nativen Gelen sowohl die individuellen Komplexe als auch höhere Assemblierungen nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den Aktivitätstests bestätigte sich, dass Komplex I enthaltende Proteinbanden im Bereich der Superkomplexe deutlich stärkere Signale lieferten als der individuelle Komplex. Bei den Komplexen III₂ und IV war dies nicht zu beobachten, die Signale für die individuellen Komplexe waren sehr stark ausgeprägt. Für Komplex V, die ATP-Synthase, konnten sowohl das Monomer und Dimer als auch höhere Oligomere bei allen Proben gefunden werden.

Die Solubilisate aus Mäuse-, Schwein-, Wildschwein-, Rehherz und Rehnere wurden mit Hilfe von 2-D BN/SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und die mitochondrialen Proteine durch "Peptide Mass Fingerprint" (an einem MALDI-TOF MS) identifiziert. Da für Rinderherzmitochondrien schon entsprechende Experimente von Kratochwil^[3] und Hunzinger *et al.*^[4] bzw. für Rattenherzmitochondrien von Reifschneider *et al.*^[5] durchgeführt worden sind, wurde bei diesen Proben auf eine weitere Analyse verzichtet. Ebenso wurden von Groebe *et al.*^[6] die mitochondrialen Proteine von Mensch und *Podospira anserina* mittels MALDI-MS untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnten abhängig vom Gewebe zwischen 29 und 36 mitochondriale Proteine identifiziert werden, hierbei handelte es sich bei ca. 80 % um Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V der oxidativen Phosphorylierung. Es war zu beobachten, dass ein Großteil der identifizierten Untereinheiten der OxPhos-Komplexe eine sehr ähnliche elektrophoretische Mobilität besitzen. Ebenso zeigte ein Vergleich mit den bei Rinder- und Rattenherz gefundenen Resultaten diese Übereinstimmungen. So konnten besonders bei der ATP-Synthase (Komplex V) der untersuchten Gewebe Untereinheiten für das Monomer, das Dimer und andere Oligomere gefunden werden. Mittels 2-D Western Blots wurden weitere Untereinheiten der OxPhos-Komplexe nachgewiesen. Für den Komplex II zeigte sich, dass dieser unter den gewählten Bedingungen (2-D BN/SDS-PAGE) nicht an der Bildung von Superkomplexen beteiligt ist und nur als individueller Komplex vorliegt. Für eine quantitative Analyse der identifizierten Proteinspots wurden 2-D Gele von den Säugetierproben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro[®] Ruby gefärbt. Die Auswertung der Gele erfolgte mit der Software Delta2D. Die Daten der Herzgewebe von Rind, Schwein, Wildschwein und Reh wurden miteinander verglichen. Die Gesamtproteinmenge für die Komplexe I, III und V lag bei diesen Proben in einem ähnlichen Bereich, es zeigten sich lediglich kleine Unterschiede bei den Verhältnissen zwischen dem individuellen Komplex und den Superkomplexen. Des Weiteren war zu beobachten, dass die ATP-Synthase in einem Bereich von 61 bis 74 %, abhängig vom Organismus, in monomerer Form vorliegt. Die größten Unterschiede waren bei der Gesamtproteinmenge von Komplex IV zu beobachten.

Bei dem Vergleich zwischen Rinder-, Mäuse- und Rattenherz traten zwischen diesen unterschiedlichen Organismen teilweise deutliche Unterschiede für die OxPhos-Komplexe I und V auf. So konnte für Ratte nachgewiesen werden, dass im Gegensatz zu den anderen untersuchten Geweben die Proteinmengen für das Monomer V₁ und das Dimer V₂ der ATP-

Synthase nahezu identisch sind. Bei Maus war zu erkennen, dass Komplex V zu mehr als 78 % in Form von V_1 vorliegt. Ebenso war bei Maus zu beobachten, dass Komplex I hauptsächlich in Superkomplex a gebunden ist. Sowohl bei Rind und Ratte, als auch bei den zuvor untersuchten Geweben (Reh, Schwein, Wildschwein) war immer Superkomplex b favorisiert.

Von den Dimeren und höheren Oligomeren von Komplex V ist bekannt, dass sie an der Gestaltung der Morphologie der Cristae beteiligt sind^[7]. Abgesehen davon steht bisher noch nicht fest, inwieweit die enzymatische Aktivität durch diese Oligomerisierung beeinflusst wird. Daher wurde für eine weitere Untersuchung der ATP-Synthase der In-Gel ATP-Hydrolyse-Aktivitätstest verwendet. Erste Versuche zeigten, dass die BN-PAGE ungeeignet war. Offensichtlich beeinträchtigte der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau die Zugänglichkeit des Substrats und auch die Detektion des gebildeten Präzipitats, daher wurde die mildere farblos-native Gelelektrophorese (CN-PAGE) für weitere Experimente ausgewählt. So konnte anhand dieser Aktivitätstests erstmals nachgewiesen werden, dass bis dato noch nicht untersuchte Säugetierproben (Reh-, Schwein-, Wildschweinherz) Oligomere der ATP-Synthase ausbilden, die eine Hydrolyse-Aktivität zeigen. Für die mitochondrialen Solubilisate aus Maus, Ratte und Rind wurden ähnliche Resultate gefunden. Im Gegensatz zu den in der Literatur gefundenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die monomere Form die höchste Hydrolyse-Aktivität besitzt und mit steigendem Assemblierungsgrad die Aktivität abnimmt. In welchem Zusammenhang die Hydrolyse mit der Synthese von ATP durch Komplex V steht ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Davon ausgehend, dass eine Verringerung der Hydrolyse-Aktivität mit einer Zunahme der ATP-Synthese korreliert, würde die Syntheserate mit steigendem Assemblierungsgrad deutlich zunehmen. Dementsprechend könnte dadurch gezielt die enzymatische Aktivität der ATP-Synthase innerhalb einer Zelle gesteuert werden ohne die de novo Expression dieses Enzymkomplexes zu verändern.

Untersuchungen von Meyer zu Tittingdorf *et al.*^[8,9] und Hema *et al.*^[10] haben gezeigt, dass äußere Stressfaktoren den metabolischen Zustand der Mitochondrien der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, welchen Einfluss unterschiedliche Temperaturen während der Wachstumsphase auf die Organisation und Funktion der OxPhos-Komplexe ausüben. Für die Kultivierung der Alge wurden zwei unterschiedliche Wachstumsbedingungen untersucht. Bei photomixotrophem Wachstum wird dem Kultivierungsmedium Acetat als Kohlenstoffquelle zugesetzt, bei photoautotrophem Wachstum muss Kohlenstoff aus der Luft, in Form von CO_2 , assimiliert werden. Für eine funktionelle Analyse der OxPhos-Komplexe I und IV wurden die oben beschriebenen In-Gel Aktivitätstests eingesetzt. Ähnlich wie auch bei den Mitochondrien in Säugetieren assemblieren die Komplexe I, III und IV in *C. reinhardtii* zu Superkomplexen, $I_1III_2IV_1$ (S1) und $I_1III_2IV_2$ (S2). Unter photomixotrophen Bedingungen zeigte sich, dass eine Erhöhung der Temperatur zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität von Komplex I (1,6-fach) und IV (1,8-fach) in den Superkomplexen S1 und S2 führte. Für die individuellen Komplexe war dieser Effekt nicht zu beobachten. Ein ähnlicher Trend war unter photoautotrophem Wachstum für Komplex I zu erkennen. Demgegenüber führte bei Komplex

IV eine erhöhte Temperatur zu einer kleinen Verringerung der spezifischen Aktivität der Superkomplexe. Durch einen Vergleich zwischen der Aktivität des individuellen Komplexes und der Superkomplexe S1 und S2 konnte erstmals auch für einen pflanzlichen Organismus gezeigt werden, dass eine Assemblierung zu Superkomplexen zu einer deutlichen Steigerung der enzymatischen Aktivität führt. Für Komplex I äußerte sich dies in einer 5-fachen und für Komplex IV in einer 10-fachen Zunahme der Aktivität.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation können wie folgt zusammengefasst werden: Sowohl in Mitochondrien aus Herzgewebe von Säugetieren als auch in den Mitochondrien von *C. reinhardtii* konnte eine Assemblierung der Komplexe I, III und IV der oxidativen Phosphorylierung zu Superkomplexen nachgewiesen werden. Bei allen untersuchten Organismen war bei den Superkomplexen eine deutliche Zunahme der enzymatischen Aktivität im Vergleich zum individuellen Komplex zu beobachten. Für die ATP-Synthase (Komplex V) konnte bei den Säugetierproben gezeigt werden, dass über den Grad der Oligomerisierung die Hydrolyse-Aktivität beeinflusst werden kann.

In Zusammenarbeit mit den Forschungsgruppen von Prof. Dr. Grüber (NTU, Singapur) und Prof. Dr. Gordeliy (IBS Grenoble; ICS Jülich; MIPT Moskau) sollte mittels Röntgenkristallographie die Struktur der Chloroplasten-ATP-Synthase aufgeklärt werden. Es gibt Kristallstrukturbilder mit hoher Auflösung von dem hydrophilen F_1 -Teil und von einigen isolierten Untereinheiten des membranintegralen F_0 -Teils, jedoch ist es bisher noch nicht gelungen den vollständigen und intakten Enzymkomplex zu kristallisieren. Zunächst wurde von mir die Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat (*Spinacia oleracea*) in größeren Mengen (100-200 mg) isoliert. Mittels BN-PAGE konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym intakt war. Die Synthese-Aktivität der isolierten ATP-Synthase wurde nach Einbau in Liposomen und Applikation eines elektrochemischen Protonengradienten ($\Delta\Psi + \Delta pH$) in einem anschließenden Luciferin-Luciferase-ATP-Test ermittelt. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Grüber wurde von Dr. Asha Manikoth Balakrishna die Kristallisation mittels Dampfdiffusionsverfahren durchgeführt. Die erhaltenen Kristalle wurden an einem Synchrotron (*Swiss Light Source*) am Paul-Scherrer-Institut (Schweiz) analysiert. Es zeigte sich, dass bis auf den c_{14} -Zylinder der ATP-Synthase alle anderen Untereinheiten während des Kristallisationsprozesses verloren gingen, die ermittelte Kristallstruktur besaß eine Auflösung von 4,50 Å. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gordeliy erfolgte die Kristallisation mittels kubischer Lipid-Phase. Obwohl auch hier von einer intakten ATP-Synthase ausgegangen worden ist, konnten unter diesen Bedingungen ebenfalls nur Kristalle des c_{14} -Zylinders erhalten werden, allerdings erstmals mit einer Auflösung von 2,48 Å.

1 Summary

This thesis focuses on the functional analysis of ATP synthases, OxPhos complexes and supercomplexes in mitochondria of mammals and of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* and the structural characterization of the chloroplastidic ATP synthase from spinach (*Spinacia oleracea*).

For the analysis of mammalian OxPhos complexes mitochondria from bovine, pig, wild boar, deer, mouse and rat (Wistar and Fischer) heart and deer kidney were isolated. The enzyme complexes were detached from the lipid bilayer with the mild detergent digitonin (solubilized) and separated by blue-native electrophoresis (BN-PAGE). The advantages of this method are the preservation of the enzymatic activity, of the three-dimensional native structure and of the protein-protein interactions. The characterization of OxPhos complexes was performed by in-gel activity tests for complexes I and IV. In these tests the enzymatic active protein complex catalyses the formation of a coloured precipitate that can be detected for every band in the gel. Previous studies of Schäfer *et al.*^[1, 2] on bovine heart mitochondria demonstrated that the OxPhos complexes I, III₂ and IV are assembling to higher-ordered structures, so called supercomplexes (SC). In this thesis the supercomplexes III₂IV₁, I₁IV₂, I₁III₂ (a), I₁III₂IV₁ (b), I₁III₂IV₂ (c) und I₁III₂IV₃ (d) were detected in mitochondria from bovine, pig, wild boar, deer, mouse, rat heart and deer kidney. The Coomassie staining of the BN-gels and the activity tests indicated that complex I is mainly associated in supercomplexes while complex IV mostly exists as individual complex. For quantitative analysis the relative specific activity of complex I and IV containing protein bands were determined by the software Delta2D. In all examined mammalian tissues the supercomplexes c and d (for complex I) possessed by far the highest specific activity. Comparison of the specific activity of the individual complex I and the supercomplexes revealed that the activity in I₁III₂IV₂ (c) and I₁III₂IV₃ (d) in bovine, pig, wild boar and deer was increased 2.3-fold. In the mouse and rat mitochondria the assembling of supercomplexes showed an increase in activity for I₁III₂IV₂ 3.4-fold and for I₁III₂IV₃ 3.6-fold. A significant enhancement of activity in comparison with the individual complex was observed in supercomplex c (12.5-fold) and supercomplex d (11,6-fold) from deer kidney.

The in-gel activity test for complex IV demonstrated that individual complex IV exhibited by far the lowest specific activity in all examined mammalian samples. The supercomplexes b and c showed for bovine, pig, wild board and deer the highest specific activity, for the mouse samples this was only observed in supercomplex b. The increase in the activity of the supercomplexes in comparison with the individual complex IV was as follows: in bovine, pig, wild boar, deer and mouse heart mitochondria for supercomplex b an 8.3-fold increase and for supercomplex c 8.0-fold (except the mouse samples). In rat heart mitochondria I₁III₂IV₁ (b) is 11.6-fold and I₁III₂IV₂ (c) 14.02-fold more active. The solubilisate of deer kidney mitochondria showed a smaller enhancement of activity for supercomplex b (factor 4.2) and c (factor 4.8).

With antibodies against the complexes I, III, IV and V the individual complexes and higher assemblies were detected in 1-D Western blots of blue native gels. In accord with the in-gel

activity tests for OxPhos complexes I and IV it was demonstrated that the signal of supercomplexes containing complex I was much stronger than that of the individual complexes. For complexes III₂ and IV this was not observed, the signal of the individual complexes were more pronounced. For complex V (the ATP synthase) the monomeric and dimeric form as well as higher oligomers were found in all samples.

The solubilisates of mouse, pig, deer, wild boar heart, and deer kidney were separated by 2-D BN/SDS-PAGE and the mitochondrial proteins were identified by peptide mass fingerprint (MALDI-TOF MS). Because similar experiments were already done for bovine heart mitochondria by Kratochwil^[3] and Hunzinger *et al.*^[4] and rat heart mitochondria by Reifschneider *et al.*^[5] further analysis of these samples was omitted. Also Groebe *et al.*^[6] examined the mitochondrial proteins in human and *Podospora anserina* samples. In this thesis between 29 and 36 proteins, dependent on the tissue sample, were identified. Approximately 80 % of these proteins were subunits of the OxPhos complexes I, III, IV and V. It was demonstrated that a large part of the identified subunits possessed a similar electrophoretic mobility. A comparison with the results of bovine and rat heart mitochondria showed a high consistency. Especially for the ATP synthase (complex V) in the examined tissues subunits for the monomeric, dimeric and higher oligomeric forms were found. Additional subunits of the OxPhos complexes were identified by 2-D Western blots. At these conditions (2-D BN/SDS-PAGE) complex II was not involved in formation of supercomplexes and existed only as individual complex. Quantitative analysis of the identified protein spots was done by staining the 2-D gels with the fluorescent dye Sypro[®] Ruby. For data evaluation the software Delta2D was used. A comparison of bovine, pig, wild boar and deer heart mitochondria revealed that the protein amount for the OxPhos complexes I, III and V was quite similar. Only small differences in the ratio between supercomplexes and individual complexes were observed. In addition to these results it was demonstrated that the ATP synthase exists mostly in monomeric form, between 61 and 72 % dependent on the examined tissue sample. The largest difference was noted for the protein amount of complex IV.

A comparison of bovine, mouse and rat heart mitochondria showed distinct differences for the protein amount in complex I and V. In rat heart samples the amount for the monomeric and dimeric form of the ATP synthase were quite similar in contrast to the other tissue samples. In mouse heart samples complex V was mostly in monomeric form (78 %). Furthermore, complex I was mostly assembled in supercomplex a. As for the other samples (bovine, rat, pig wild boar, deer) supercomplex b was always preferred.

For the dimers and other oligomers of complex V it is known that they are involved in the formation of the cristae morphology in mitochondria^[7]. It is so far still unknown, if and how much the enzymatic activity is influenced by this oligomerization. Therefore the ATP hydrolysis activity of the monomer as compared to the oligomeric state was analyzed by in-gel activity tests. Initial experiments showed that the BN-PAGE was not suitable for this approach. The anionic dye Coomassie Brilliant Blue interfered with the accessibility of the substrate and the detection of the precipitate on the gel. Therefore the milder colorless native

electrophoresis (CN-PAGE) was used for further experiments. It was demonstrated for the first time that ATP synthase in deer, pig and wild boar mitochondria forms also oligomers, which exhibited a ATP hydrolysis activity. Similar results were found for the well examined rat, mouse and bovine heart samples. In contrast to the findings in the literature the monomeric form of complex V showed the highest hydrolysis activity, the dimers and other oligomers exhibited reduced activity depending on the degree of assembling. The relation between the hydrolysis and the synthesis of ATP by complex V is still unknown. If it is assumed that the reduction in the hydrolysis activity correlates to an increase in synthesis activity, then the synthesis rate would be increased with the oligomeric state of the ATP synthase. According to this the enzymatic activity could then be specifically adjusted to the demand of the cell without changing the de novo expression rate of complex V.

The research of Meyer zu Tittingdorf *et al.*^[8,9] and Hema *et al.*^[10] demonstrated that environmental stress factors affect the metabolic state in mitochondria of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Therefore the influence of different temperatures during the cultivation period on the organization and the enzymatic activity of the OxPhos complexes was analyzed in this thesis. Two cultivation conditions were examined: In photomixotrophic growth the medium contained acetate as a additional carbon source, in photoautotrophic growth carbon dioxide from the air was assimilated. For a functional analysis of the OxPhos complexes I and IV the described in-gel activity tests were employed. Similar to mitochondria in mammals the complexes I, III₂ and V of *C. reinhardtii* assemble into supercomplexes, I₁III₂IV₁ (S1) and I₁III₂IV₂ (S2). Under photomixotrophic conditions an elevation of temperature during the cultivation period led to an increase in the activity of complex I (1.6-fold) and IV (1.8-fold) in the supercomplexes S1 and S2. The individual complex showed no increase in activity. Similar tendencies were observed for complex I under photoautotrophic cultivation. In contrast to these findings the activity of complex IV exhibited a small decrease while cultivated at higher temperatures. A comparison of the activity of the individual complexes with the supercomplexes S1 and S2 revealed that the assembling into supercomplexes in plant-like organisms led to an increase in activity. For complex I the enhancement was 5-fold and for complex IV 10-fold.

The results of this thesis can be summarized as follows: In mitochondria from mammalian heart tissues and from the green algae *C. reinhardtii* the OxPhos complexes I, III₂ and IV are assembled into supercomplexes. In all examined samples the supercomplexes showed a significant increase in enzymatic activity in comparison to the individual complexes. For the ATP synthase it was demonstrated that the ATP hydrolysis activity was influenced by the oligomeric state.

In cooperation with the research groups of Prof. Dr. Grüber (NTU, Singapore) and of Prof. Dr. Gordeliy (IBS Grenoble; ICS Jülich; MIPT Moscow) the structure of the chloroplast ATP synthase was examined by X-ray crystallography. Crystal structures of the hydrophilic domain F₁ and some isolated subunits of the membran integral F₀-domain are known, but to date nobody was able to crystallize the whole intact enzyme complex. The chloroplast ATP synthase from spinach (*Spinacia oleracea*) was isolated in sufficient amount (100-200 mg).

By BN-PAGE it was demonstrated that the enzyme complex was intact after the isolation. For measuring the synthesis activity, the ATP synthase was reconstituted in liposomes, an electrochemical proton gradient ($\Delta\Psi + \Delta\text{pH}$) was applied and subsequently an luciferin-luciferase-ATP-assay was performed. In Prof. Dr. Grüber's research group Dr. Asha Manikkoth Balakrishna used the vapour diffusion method for crystallization experiments. The obtained crystals were analyzed by a synchrotron (*Swiss Light Source*) at the Paul Scherrer Institut (Switzerland). Except the c_{14} -cylinder all other subunits were lost during the crystallization process, the calculated crystal structure had a resolution of 4,50 Å. In Prof. Dr. Gordeliy's research group crystallization was done using the lipidic cubic phase method. While starting with the intact enzyme complex, under these conditions also only crystals of the c_{14} -cylinder were obtained, but for the first time with a resolution of 2,48 Å.

2 Einleitung

2.1 Mitochondrien

Mitochondrien spielen eine Schlüsselrolle in dem Energiemetabolismus der Zelle^[11]. Durch die oxidative Phosphorylierung wird der universelle Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) synthetisiert. Darüber hinaus finden in ihnen noch zahlreiche andere Stoffwechselvorgänge statt: Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (NADH, FADH₂) durch den Citratzyklus, Abbau von Fettsäuren, Biosynthese von Häm-Gruppen und Eisen-Schwefel-Clustern, Produktion von sekundären Botenstoffen (*second messenger*), z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS)^[7]. Zusätzlich sind sie an der Signalübertragung durch Calcium^[12] beteiligt und es wird davon ausgegangen, dass sie einen großen Einfluss auf die Vorgänge der Apoptose^[13], des Alterns^[14] und bei neurodegenerativen Krankheiten^[15, 16] ausüben. Bei Mitochondrien handelt es sich um Organellen, die in lebenden Zellen ein hochgradig dynamisches Netzwerk ausbilden. Durch Teilung und Fusion entsteht so ein sich ständig veränderndes Gebilde, in dem Proteine, Lipide, mitochondriale DNA und Metabolite ausgetauscht werden^[17]. Wenn Mitochondrien aus Geweben isoliert werden, bricht dieses Netzwerk auseinander und die einzelnen intakten Kompartimente trennen sich spontan. Diese isolierten Mitochondrien sind weiterhin in der Lage Zellatmung zu betreiben und ATP zu synthetisieren^[18, 19]. Ebenso bleibt die Membranzusammensetzung, die Organisation und enzymatische Funktion der Proteine in der inneren Mitochondrienmembran erhalten^[7].

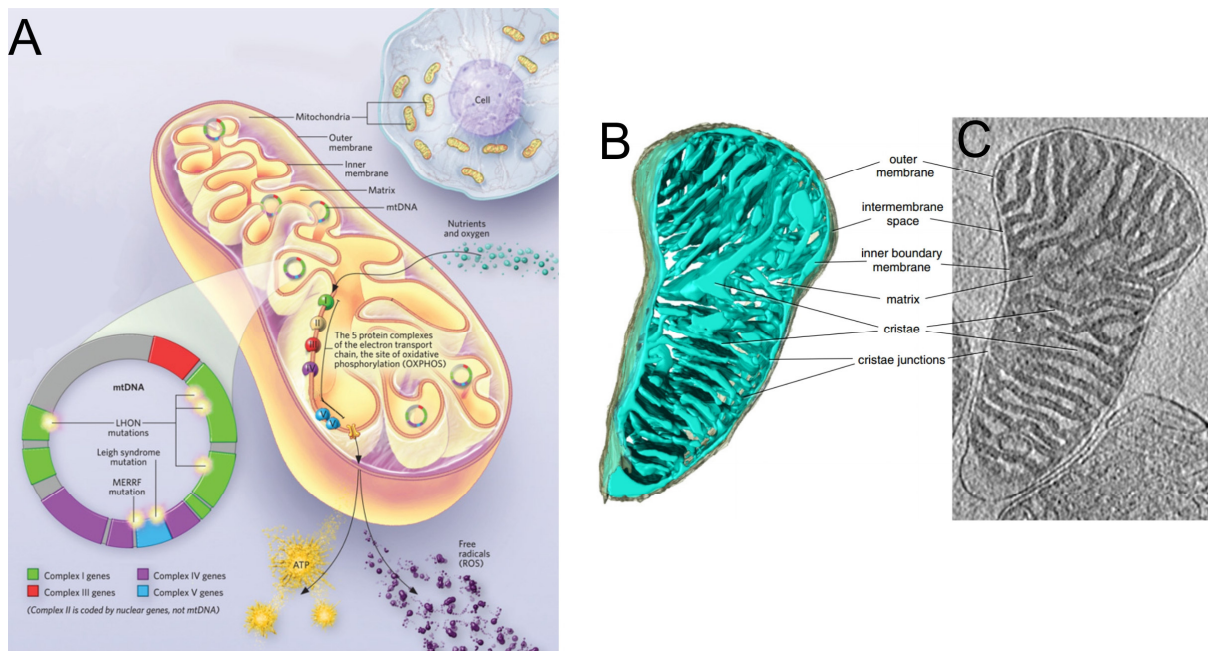


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines Mitochondriums (A), modifiziert nach Swift^[20]. Die Komplexe der oxidativen Phosphorylierung sind farbig dargestellt: NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I, grün), Succinat-Dehydrogenase (Komplex II, gelb), Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III, rot), Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV, lila), ATP-Synthase-Dimer (Komplex V, blau). Nur 13 Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V sind mitochondrial codiert. **Drei-dimensionale Darstellung eines Mäuseherzmitchondriums (B) und tomographischer Querschnitt (C), ermittelt durch Kryo-Elektronentomographie^[7].**

An den Stoffwechselvorgängen der oxidativen Phosphorylierung sind die fünf Atmungskettenkomplexe (OxPhos-Komplexe I-V) beteiligt, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind (Abbildung 2.1). Im Zuge der Translokation der Elektronen aus den Reduktionsäquivalenten NADH und FADH₂ durch die OxPhos-Komplexe I-IV auf molekularen Sauerstoff werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert. Lediglich der Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase, nimmt hierbei eine Sonderstellung ein. Sie transportiert keine Protonen und ist vielmehr als eine Verbindung zu dem Citratzyklus anzusehen. Die aus der Oxidation von Succinat zu Fumerat stammenden Elektronen werden auf FADH₂ übertragen und so der oxidativen Phosphorylierung zur Verfügung gestellt. Komplex I, die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase, katalysiert den Transport von vier Protonen und die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol. Anschließend werden die Elektronen über Komplex III, die Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase, auf Cytochrom *c* übertragen. Im Zuge dessen werden zwei Protonen von der Matrix in den Intermembranraum transportiert. Danach werden die Elektronen von Komplex IV, der Cytochrom-*c*-Oxidase, auf Sauerstoff übertragen. Während dieser Redoxreaktion werden vier Protonen aus der Matrix für die Synthese von Wasser und darüber hinaus vier weitere Protonen transloziert. Der dabei aufgebaute elektrochemische Protonengradient ($\Delta\Psi + \Delta\text{pH}$) wird von der ATP-Synthase (Komplex V) für die Synthese von ATP genutzt^[21, 22].

Die OxPhos-Komplexe I, III und IV liegen nicht nur als individuelle Komplexe vor, sondern können sich auch zu übergeordneten Strukturen, den sogenannten Superkomplexen (Abbildung 2.2), zusammenlagern. Die Vorteile dieser Assemblierungen liegen in einer Steigerung der katalytischen Aktivität, effektiveren Elektronenübertragung bedingt durch kurze Wegstrecken der Elektronentransporter Ubichinon und Cytochrom *c* und eine Stabilisierung der Komplexe^[1, 23, 24].

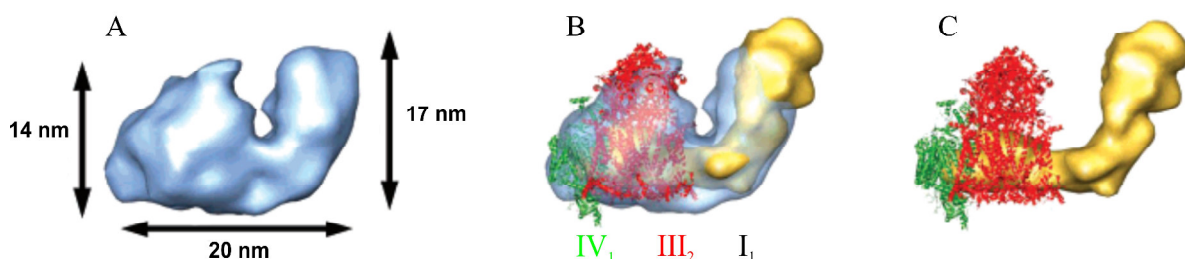


Abbildung 2.2: 3-D Karte des Superkomplexes b (I₁III₂IV₁) aus Rinderherzmitochondrien mit den eingepassten Strukturen der individuellen OxPhos-Komplexe, nach Schäfer *et al.*^[2]. Oberflächendarstellung des Superkomplexes b mit Maßstab (A), transparente Oberflächendarstellung mit in das Volumen angepassten individuellen Komplexen (B), Anordnung der individuellen Komplexe bei der Bildung des Superkomplexes (C).

2.2 ATP-Synthase

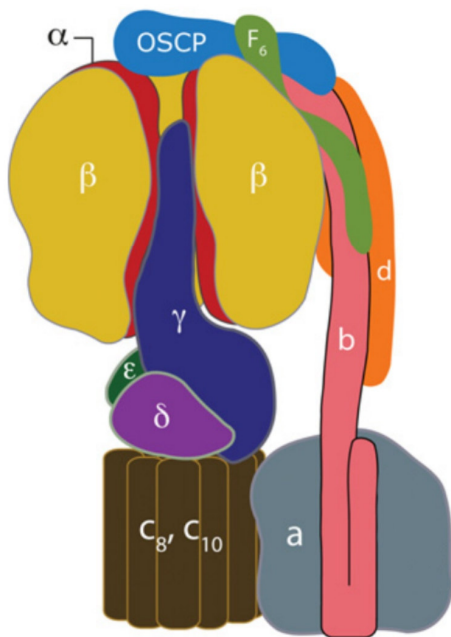
ATP ist die universelle Energieeinheit aller lebenden Zellen auf unserem Planeten^[25]. Die bei der Hydrolyse dieses Moleküls freigesetzte Energie wird für den Stofftransport, die Signalweiterleitung in Nervenzellen, Muskelkontraktionen, die Wärmeproduktion und die Biosynthese von Proteinen, Polysacchariden, Ribonukleotiden, Lipiden und anderen Stoffwechselzwischenprodukten verwendet. Da es an so vielfältigen Prozessen beteiligt ist, ist der Verbrauch an ATP sehr groß und es muss ständig regeneriert werden. Ein erwachsener Mensch verbraucht pro Tag zwischen 40 - 75 kg ATP abhängig von der körperlichen Anstrengung^[26, 27]. Davon ausgehend, dass die "steady state"-Menge dieses Nukleotids im Bereich von 50 g (100 mmol) liegt, müsste dieses energiereiche Molekül 800 bis 1500 mal pro Tag recycelt werden^[26].

Die Herstellung von ATP erfolgt zu mehr als 90% durch die ATP-Synthase^[28, 29]. Angetrieben durch einen elektrochemischen Protonengradienten über einer Membran wird die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat von diesem Enzymkomplex katalysiert (Chemiosmotische Theorie von Mitchell^[30]). Bei der ATP-Synthase handelt es sich um ein hoch konserviertes Strukturmotiv, dass in Säugetieren, Pflanzen und Bakterien nachgewiesen werden konnte. Für Säugetiere wurde die mitochondriale ATP-Synthase in Rinderherzmitochondrien^[31], für Pflanzen die chloroplastidäre ATP-Synthase in Chloroplasten von Spinat (*Spinacia oleracea*)^[32] und auch eine bakterielle ATP-Synthase in *Escherichia coli*^[33] gefunden. Für den Aufbau des oben beschriebenen Protonengradienten sind in diesen unterschiedlichen Organismen verschiedene Proteinkomplexe verantwortlich. Während in den Mitochondrien im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung Protonen von den Atmungskettenkomplexen über die innere Membran transportiert werden, erfolgt der Transport von Protonen in den Chloroplasten durch die Photosysteme I und II und den Cytochrom-*b₆f*-Komplex bei der Photosynthese, der Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie. In Bakterien, die Zellatmung betreiben, befinden sich ähnlich den Mitochondrien Proteine einer Elektronentransportkette, die Protonen über die Zellmembran transportieren^[34, 35].

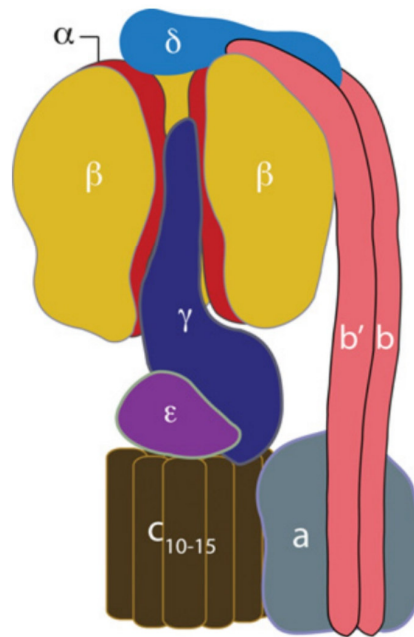
2.2.1 Aufbau und Funktion

Während der letzten 2 Milliarden Jahre der Evolution von einem einfachen Bakterium bis hin zu so komplexen Organismen, wie den Säugetieren, ist die räumliche Struktur der ATP-Synthase weitgehend erhalten geblieben^[36]. Dieser Enzymkomplex setzt sich aus einem hydrophilen Kopfteil F_1 (Molmasse ~500 kDa) und einem membranintegralen Teil F_0 (Molmasse ~150 kDa) zusammen. Die Bezeichnung "o" stammt von ersten Experimenten von E. Racker^[37]. Er konnte nachweisen, dass durch Zugabe von Oligomycin die Synthese bzw. Hydrolyse von ATP durch die ATP-Synthase inhibiert wird. Der strukturelle Aufbau des Kopfteils F_1 ist mittlerweile weitgehend untersucht worden. So konnten Abrahams *et al.*^[31] bereits 1994 eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,8 Å präsentieren. Sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten und Bakterien setzt sich F_1 aus mindestens 4 globulären Untereinheiten, α , β , γ und ϵ mit der Stöchiometrie $\alpha_3\beta_3\gamma_1\epsilon_1$ zusammen^[38, 39]. Die Untereinheiten α und β besitzen eine ähnliche dreidimensionale Struktur^[31, 40, 41] und sind in

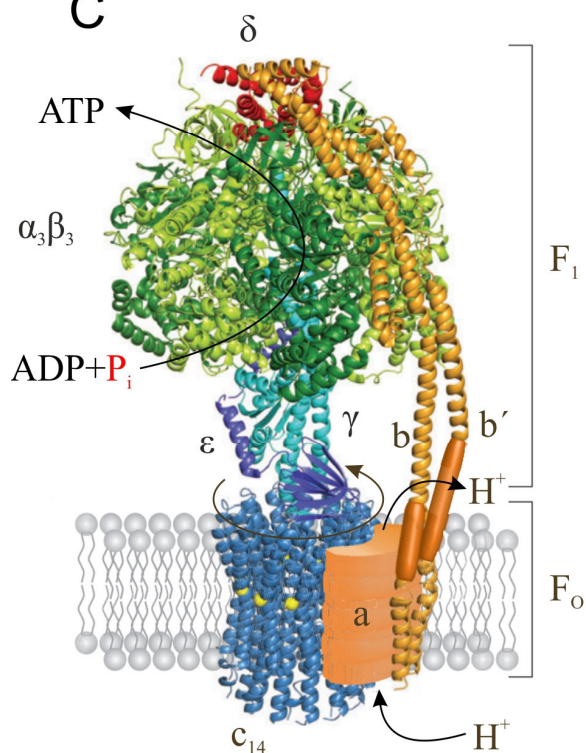
A



B



C



D

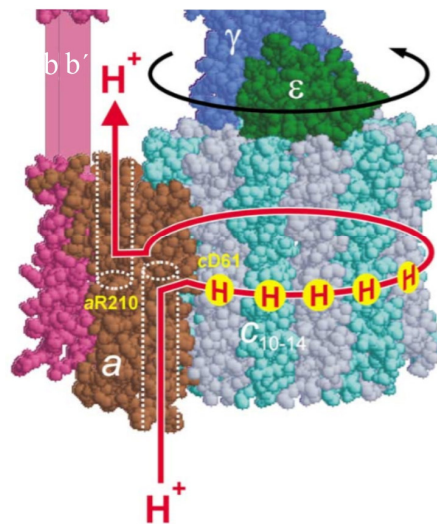


Abbildung 2.3: Aufbau der ATP-Synthase in Mitochondrien (A) und Chloroplasten (B), modifiziert nach Walker *et al.*^[36]. Modell der ATP-Synthase der Chloroplasten-ATP-Synthase (C), modifiziert nach Ballmoos *et al.*^[25]. Modell der Rotation des c-Zylinders in der membranintegralen F₀-Domäne aufgrund der Protonentranslokation (D), modifiziert nach Weber *et al.*^[42].

alternierender Anordnung zu einem Hexamer zusammengesetzt (Abbildung 2.3 A und B). Das katalytische Zentrum für die ATP-Synthese bzw. -Hydrolyse befindet sich in der Untereinheit β . Die Untereinheit γ ragt in das Zentrum dieses Hexamers. Bei der chloroplastidären ATP-Synthase ist zusätzlich die Untereinheit ϵ , bei der mitochondrialen ATP-Synthase sind die Untereinheiten δ und ϵ an γ gebunden. Diese Untereinheiten verbinden die Untereinheiten des F_1 -Teils mit dem membranintegralen Teil und werden unter anderem auch als zentraler Stiel bezeichnet. Auch wenn die Bezeichnung dieser Untereinheiten unterschiedlich ist, wird davon ausgegangen, dass ϵ in Chloroplasten bzw. δ in Mitochondrien eine ähnliche Struktur und Funktion besitzen^[36]. Ein entsprechendes Pendant für die mitochondriale Untereinheit ϵ konnte bisher weder in Chloroplasten noch in Bakterien nachgewiesen werden.

Über den membranintegralen F_0 -Teil liegen im Gegensatz dazu nur teilweise strukturelle Informationen vor. Bedingt durch dessen hydrophobe Natur gestaltet sich die Isolierung und Kristallisation dieses Subkomplexes sehr schwierig. Dementsprechend ist es bisher niemand gelungen eine vollständige und funktionell intakte ATP-Synthase zu kristallisieren. Bei den in Abbildung 2.3 A, B und C gezeigten Darstellungen handelt es sich um ein in der Forschung akzeptiertes Modell, dass auf kristallographischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der isolierten Untereinheiten basiert. In Chloroplasten setzt sich diese Domäne aus der Untereinheit a (IV), einem Homooligomer von c (III) und den Untereinheiten b (I) bzw. b' (II) zusammen. In vielen Veröffentlichungen werden anstelle der arabischen Buchstaben auch häufig römische Zahlen verwendet. Im Unterschied zum chloroplastidären Pendant stellen bei der mitochondrialen ATP-Synthase b, d und F₆ die Verbindung zur Domäne F_1 dar. Die äußeren Untereinheiten (b, b', δ bzw. b, d, F₆, OSCP), welche die hydrophilen und membranintegralen Untereinheiten verbinden, werden auch als peripherer Stiel bezeichnet.

Basierend auf den Forschungen der letzten 30 Jahre hat sich folgendes Modell für die Translokation von Protonen und der damit verbundenen Synthese von ATP etabliert: Aufgrund eines elektrochemischen Protonengradienten kommt es zu einem Protonenfluss durch die Untereinheit a und das c-Oligomer. Dies führt zu einer Rotationsbewegung des Oligomers^[43, 44], die an die Untereinheit γ übertragen wird (Abbildung 2.3 C, D). In Bakterien beträgt die Rotation des c-Zylinders ~100 Umdrehungen pro Sekunde^[45]. Der periphere Stiel verhindert hierbei eine Eigenrotation des α, β -Hexamers. Stattdessen bewirkt diese Drehbewegung Konformationsänderungen in den katalytischen Zentren der β -Untereinheiten. Dadurch ändern sich die Bindungseigenschaften für ATP, ADP und Phosphat der jeweiligen Untereinheit. Nach dem Bindungswechsel-Mechanismus von Boyer^[46] gibt es drei unterschiedliche Konformationen, welche die β -Untereinheit einnehmen kann: offen, fest und geschlossen. Nur in der geschlossenen Konformation ist die Synthese von ATP begünstigt^[47]. Bei einer vollständigen Drehbewegung des F_1 -Teils können demzufolge 3 Moleküle ATP synthetisiert werden. Bezogen auf das c-Oligomer ist dafür eine Rotation um 360° notwendig (Abbildung 2.3 D). Die Anzahl Protonen, die für die Synthese von ATP über die Membran transportiert wird, bezeichnet man als Kopplungsverhältnis (H^+/ATP). Hieraus lassen sich

Rückschlüsse auf die Energieeffizienz der ATP-Synthase ziehen^[48]. Erste Untersuchungen von Jones und Fillingame^[49] deuteten darauf hin, dass zwischen 9 und 12 Protonen für eine vollständige Rotation transportiert werden müssen und dementsprechend das c-Oligomer aus 9 bzw. 12 Untereinheiten aufgebaut ist. Dies hätte den Vorteil, dass bei 3 katalytischen Zentren ganzzahlige Kopplungsfaktoren von 3 und 4 bei dem Verhältnis von transportierten Protonen zu gebildetem ATP entstehen. Bereits einige Jahre später wurde diese Theorie allerdings widerlegt. So konnte für die chloroplastidäre ATP-Synthase aus Spinat (*Spinacia oleracea*) von Seelert *et al.*^[50] nachgewiesen werden, dass das c-Oligomer aus 14 Untereinheiten aufgebaut ist. Im Gegensatz dazu zeigte Stock *et al.*^[39] für die mitochondriale ATP-Synthase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, dass es sich bei dem c-Zylinder um ein Homodecamer handelt. Bei Rinderherzmitochondrien besteht der c-Zylinder aus 8 Untereinheiten^[28] und es ist wahrscheinlich, dass diese Teil der ATP-Synthase in allen Wirbeltieren ähnlich aufgebaut^[36]. Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass bei Mitochondrien ein Kopplungsverhältnis zwischen 2 und 3,8, bei Chloroplasten zwischen 2 und 5, bei Bakterien zwischen 2 und 4,3 vorliegt^[51]. In Abbildung 2.4 sind die Strukturen der c-Oligomere unterschiedlicher Organismen dargestellt.

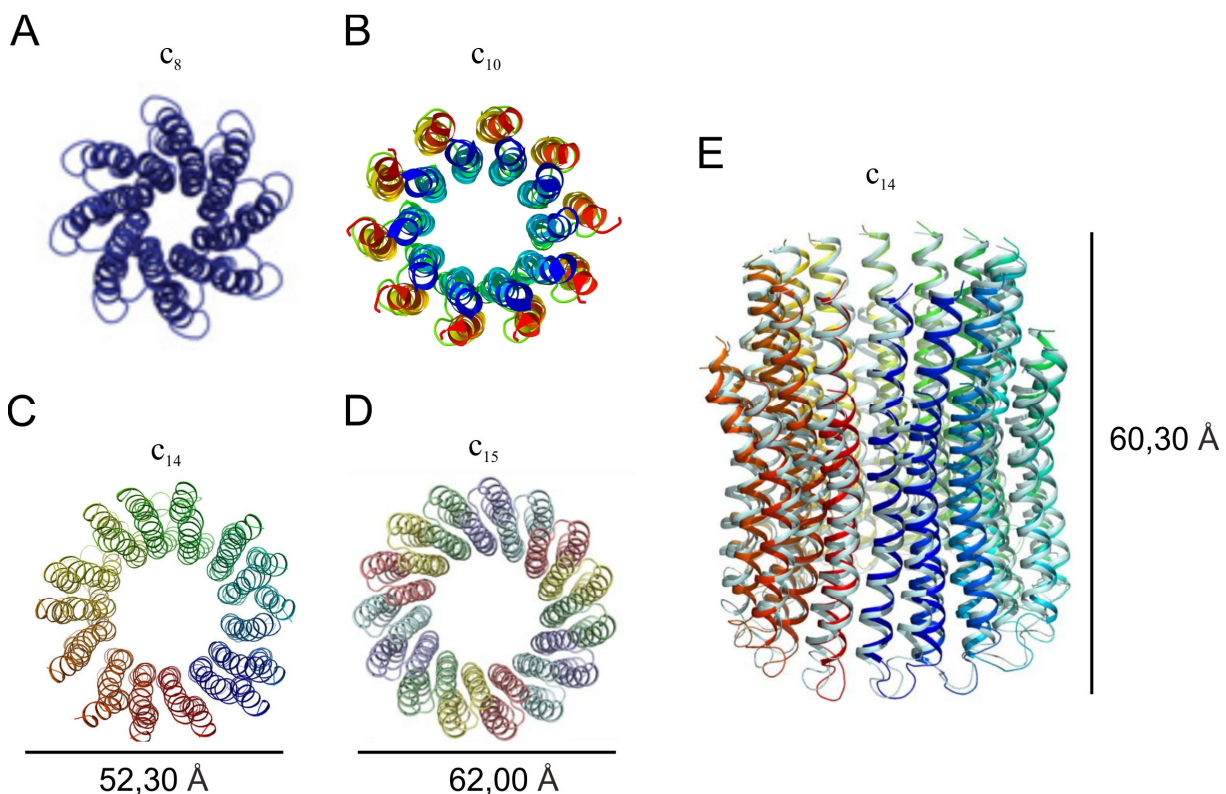


Abbildung 2.4: Struktur des c-Oligomers der F₀-Domäne der ATP-Synthase. Die Darstellungen stammen von folgenden Organismen: **A:** c₈ aus Rinderherzmitochondrien^[28], **B:** c₁₀ aus Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae*^[52], **C:** c₁₄ aus Chloroplasten von Spinat (*Spinacia oleracea*)^[53] und **D:** c₁₅ aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis*^[54] **E:** Seitenansicht des c₁₄-Rings aus Spinatchloroplasten^[53].

2.2.2 Rolle der Dimere

Für viele Jahre wurde vermutet, dass die ATP-Synthase (Komplex V) entsprechend dem Flüssig-Mosaik-Modell nach Hackenbrock *et al.*^[55] als individuelle Einheit zufällig in der inneren Mitochondrienmembran diffundiert. Erste Hinweise darauf, dass die ATP-Synthase in Form von Dimeren in den Krümmungen der Cristae verteilt sind, lieferte Allen *et al.*^[56]. Sie untersuchten Mitochondrien des Pantoffeltierchens *Paramecium multimicronucleatum* mittels "rapid-freeze deep-etch"-Elektronenmikroskopie. Ähnliche Untersuchungen an den Mitochondrien von Säugetieren schlugen allerdings fehl^[56]. Daher herrschte Uneinigkeit darüber, ob diese strukturelle Anordnung nur eine Besonderheit des Pantoffeltierchens ist oder auch in anderen mitochondrialen Systemen auftritt. Mit dem Aufkommen der nativen Elektrophorese (BN- und CN-PAGE) in Verbindung mit milden Solubilisierungsdetergenzien (z. B. Digitonin) konnten auch in den Mitochondrien anderer Organismen Dimere der ATP-Synthase nachgewiesen werden: den Grünalgen *Chlamydomonas*^[57] und *Polytomella*^[58], der Hefe^[59-61], dem filamentösen Pilz *Podospora anserina*^[62], in Rinderherz^[63] und Rattenherz^[64], und verschiedenen Pflanzenspezies^[65].

Bei dem Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* sind die Untereinheiten e, g, i und k an der Bildung von Dimeren beteiligt^[7]. Knock-out Stämme, die weder die Untereinheit e noch g besitzen, zeigen in der inneren Mitochondrienmembran nur die monomere Form der ATP-Synthase. Ebenso ist die Morphologie der Cristae gestört und es bilden sich zwiebelartige Strukturen aus^[60, 66-68]. Obwohl der Verlust dieser Untereinheiten nicht tödlich ist, wachsen diese veränderten Stämme um 60 % langsamer als der Wildtyp und die Mitochondrien besitzen ein deutlich niedrigeres Membranpotential^[69]. Die Untereinheit i begünstigt die Anlagerung der dimer-spezifischen Untereinheiten an das Monomer der ATP-Synthase. Die Untereinheit k konnte bisher nur bei der dimeren Form nachgewiesen werden^[59, 70], es wird angenommen, dass sie sich an die Untereinheiten e und g anlagert. Nach Wagner *et al.*^[11] wird folgendes Modell für die Assemblierung des Dimers der ATP-Synthase angenommen (Abbildung 2.5 A): Untereinheit i fördert die sequentielle Anlagerung der Untereinheiten e und g, wodurch das Monomer“ gebildet wird. Die Assoziation von zwei Monomeren“ führt zur Bildung des Intermediates Dimer“. Durch weitere Konformationsänderungen wird das "reife" Dimer gebildet, welches durch die Untereinheit k stabilisiert wird.

Untersuchungen von Fronzes *et al.*^[71] deuten darauf hin, dass auch die Untereinheit h des peripheren Stiel unabhängig von den oben genannten dimer-spezifischen Untereinheiten an der Bildung von Dimeren beteiligt sein kann. Experimente von Davies *et al.*^[72, 73] mittels Kryo-Elektronentomographie an intakten Mitochondrien zeigen allerdings, dass nur Untereinheiten der membranintegralen F_O-Domänen der ATP-Synthasen an der Dimerisierung beteiligt sind und die Untereinheiten der peripheren Stiel zu weit entfernt sind für eine Protein-Protein-Wechselwirkung. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass das Inhibitorprotein IF₁ durch Bindung an die hydrophilen F₁-Domänen zweier Monomere die Assemblierung des Dimers stabilisiert^[74, 75]. Eine weitere Aufgabe von IF₁ besteht darin, die Hydrolyse von ATP durch die ATP-Synthase im Falle eines Protonenmangels zu unterbinden.

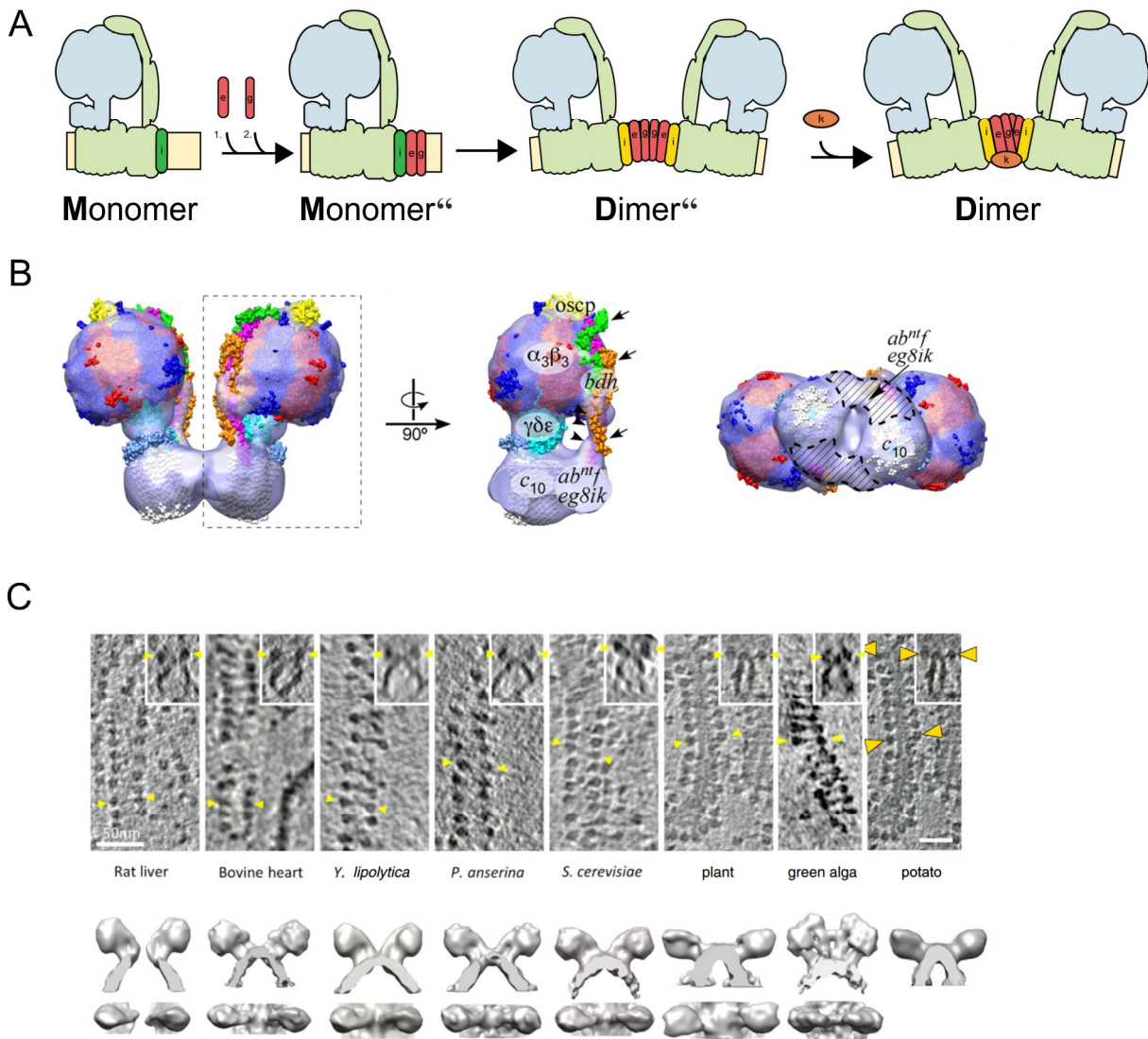


Abbildung 2.5: Modell der Assemblierung der ATP-Synthase Dimere (A)^[11]. Beteiligung der Untereinheiten i, e, g und k an der Bildung des Dimers. **Drei-dimensionale Rekonstruktion des ATP-Synthase Dimers des Hefestamms *Saccharomyces cerevisiae* (B)^[76].** Für die Rekonstruktion wurden die Kristallstrukturen von F_1c_{10} (PDB 2wss), des peripheren Stiel (b,d,F6, PDB 2cly) und die kryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen verwendet. **Reihen von ATP-Synthase Dimeren in unterschiedlichen Organismen (C), modifiziert nach Davies et al.^[72] und Kühlbrandt et al.^[7].** Oben: Ausschnitte der Kryo-Elektronentomographie, gelbe Pfeile zeigen auf die F_1 -Kopfteile eines Dimers, Maßstab = 50 nm. Unten: Oberflächenpräsentationen der Subtomogramme der einzeln aufgelösten Dimere.

Wie oben erwähnt, sind auch in den Grünalgen *Chlamydomonas* und *Polytomella* Dimere zu finden. Im Gegensatz zu den ATP-Synthasen aus Hefen und Säugetieren zeichnen sich diese Assemblierungen allerdings durch eine deutlich höhere Stabilität aus^[57]. Bei einer Solubilisierung mit dem milden Detergens Digitonin und anschließender nativer Elektrophorese findet kein Zerfall der ATP-Synthase Dimere statt und es ist keine Bande für das Monomer von Komplex V zu finden. Vazquez-Acevedo et al.^[77] haben gezeigt, dass bei *Polytomella* die klassischen Untereinheiten, die an dem peripheren Stiel und der Dimerbildung in Säugetieren und Hefen beteiligt sind, nicht auftreten. Stattdessen übernehmen 9 Untereinheiten (ASA1 bis ASA9), deren evolutionäre Herkunft bisher nicht

geklärt ist und die bisher nur in Grünalgen nachgewiesen werden konnten, eine ähnliche Funktion^[78]. Besonders die Untereinheiten ASA1 bis ASA5 sind nach Villavicencio-Queijeiro *et al.*^[79] für dessen Stabilität verantwortlich.

Welche Bedeutung kommt nun diesen Assemblierungen der ATP-Synthase zu? Viele experimentelle Daten, die mittels Kryo-Elektronentomographie bzw. -Elektronenmikroskopie erhalten wurden, haben gezeigt, dass die ATP-Synthase Dimere/Oligomere hauptsächlich in den Krümmungen der Cristae zu finden sind. Dort treten sie meist in Form von zahlreichen Zweier-Reihen auf (Abbildung 2.5 C). Davies *et al.*^[72] haben dieses Strukturmotiv in Mitochondrien von Pflanzen, Hefen, Algen und Säugetieren nachgewiesen. Auch die Experimente an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*^[60, 66-68] haben gezeigt, dass Eingriffe in den Dimerisierungsprozess die Morphologie der Cristae erheblich beeinflussen. Die Untersuchungen von Kühlbrandt *et al.*^[7] deuten sogar darauf hin, dass es sich bei der Anordnung der ATP-Synthase Dimere zu Zweier-Reihen um einen eigenständigen Vorgang handelt, an dem keine weiteren Proteine beteiligt sind. Bei der Rekonstitution isolierter Dimere in Liposomen konnte eine Selbstassoziation zu Zweier-Reihen und dementsprechend eine Bildung von lokalen Krümmungen in der Lipiddoppelschicht beobachten werden^[7, 73]. Ob die Dimerisierung neben der Beeinflussung der Cristaemorphologie noch andere Funktionen besitzt, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach einem Modell von Strauss *et al.*^[80] handelt es sich bei den Cristae um sogenannte Protonenfallen, welche die Anreicherung von Protonen in diesen Segmenten begünstigen und dadurch die Performance der ATP-Synthase deutlich erhöhen. Ebenso gibt es bei Garcia-Trejo *et al.*^[81] und Minauro-Sanmiguel *et al.*^[82] Hinweise darauf, dass durch die Dimerisierung eine effizientere Synthese von ATP gewährleistet ist.

Lange glaubte man, dass diese Oligomerisierung der ATP-Synthase ausschließlich in Mitochondrien zu finden ist. Rexroth *et al.*^[83] haben erstmals in den Thylakoiden von *C. reinhardtii* nachgewiesen, dass auch die Chloroplasten-ATP-Synthase Dimere bildet. Im Gegensatz zu dem mitochondrialen Pendant besitzt es eine deutlich niedrigere Stabilität. Erhöhte Konzentrationen an Phosphat bzw. Vanadat im Kultivierungsmedium begünstigen die Dissoziation zu der monomeren Form^[83]. Ebenso konnten keine dimer-spezifischen Untereinheiten nachgewiesen werden^[83-85]. Untersuchungen von Rexroth *et al.*^[83] deuten allerdings drauf hin, dass bei dieser ATP-Synthase nicht der membranintegrale Teil (wie bei dem mitochondrialen Pendant), sondern der hydrophile Kopfteil F_1 an der Bildung der Dimere beteiligt ist. Des Weiteren haben Schwassmann *et al.*^[84] herausgefunden, dass der metabolische Zustand von *C. reinhardtii* entscheidend die Dimerisierung der Chloroplasten-ATP-Synthase beeinflusst. Während die Proteinmenge an ATP-Synthase sowohl bei photomixotropher Kultivierung (Acetat als Kohlenstoffquelle) als auch bei photoautotropher Kultivierung (CO_2 aus der Atmosphäre als Kohlenstoffquelle) nahezu identisch ist, ist die Menge an Dimer bei der photomixotrophen Anzucht fast doppelt so hoch^[84]. Unter anderem deuten diese Daten darauf hin, dass dem chloroplastidären Dimer eine andere Funktion zukommt als dem mitochondrialen. Ist der Energiebedarf der Zelle ausreichend gedeckt, wird ein Teil der ATP-Synthasen durch Dimerisierung inaktiviert. Ein erhöhter Gehalt an Phosphat

(durch Hydrolyse von ATP) führt zu einer Dissoziation dieser Assemblierungen, wodurch wieder aktive Monomere zur Verfügung gestellt werden. Es handelt sich somit um einen Mechanismus zur gezielten Regulation der Synthese-Aktivität.

2.3 Motivation

Das Ziel dieser Arbeit ist eine Charakterisierung der Atmungskettenkomplexe und ihrer Assemblierungen (Superkomplexe, Oligomere der ATP-Synthase) in unterschiedlichen Säugetieren und pflanzlichen Systemen. Darüber hinaus soll die ATP-Synthase, ein Strukturmotiv, dass sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten zu finden ist, analysiert werden. Dazu werden Mitochondrien aus Herzgeweben von Rind, Schwein, Wildschwein, Reh, Ratte, Maus, aus Rehnierengewebe und aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* isoliert. Mit Hilfe der nativen Elektrophorese (BN- und CN-PAGE) sollen die OxPhos-Komplexe unter Erhalt ihrer nativen Struktur und ihrer enzymatischen Funktion aufgetrennt und untersucht werden. Durch In-Gel Aktivitätstests der Komplexe I, IV und V werden weitere Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung dieser Komplexe und deren übergeordnete Strukturen, den sogenannten Superkomplexen, in den verschiedenen metabolischen Systemen gewonnen. Des Weiteren sollen mittels "Peptide Mass Fingerprint" und Western Blots diese Enzymkomplexe in 2-D BN/SDS-Gelen identifiziert und weiter charakterisiert werden. Für eine Quantifizierung der Atmungskettenkomplexe in 2-D Gelen wird eine Fluoreszenzfärbung mit dem Farbstoff Sypro[®] Ruby durchgeführt. Die Chloroplasten-ATP-Synthase soll aus Spinat (*Spinacia oleracea*) intakt isoliert und Kristallisationsexperimente zur Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie vorbereitet werden.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
1,4-Dithiothreitol, p. A. (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG	6908.2
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich Co. LLC	D5905
4-Iodophenylborsäure (4-IPBA)	Sigma-Aldrich Co. LLC	471933
6-Aminohexansäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	3113.2
Aceton technisch	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Acetonitril, Rotisolv® HPLC ultra gradient grade	Carl Roth GmbH + Co. KG	T195.2
Adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP)	Sigma-Aldrich Co. LLC	A2745
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP)	Sigma-Aldrich Co. LLC	A3377
Albumin Fraktion V (bovine serum albumin, BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG	8076.2
Ammoniumchlorid, p. A. (NH ₄ Cl)	Carl Roth GmbH + Co. KG	K298.1
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O)	Fluka Chemie GmbH	9878
Ammoniumperoxodisulfat, p. A. (APS)	Fluka Chemie GmbH	9915
Ammoniumsulfat, p. A. ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3746.1
Ampicilin	Carl Roth GmbH + Co. KG	K029.1
Ampipol A8-35	Affymetrix, Inc	A835
Antimycin a from <i>Streptomyces A.</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC	A8674
Asolectin	Sigma-Aldrich Co. LLC	11145
Bernsteinsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC	S9512
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (BIS-TRIS)	Sigma-Aldrich Co. LLC	B7535
Bleinitrat, p. A. (Pb(NO ₃) ₂)	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Borsäure, p. A. (H ₃ BO ₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG	6493
Bromphenolblau	Fluka Chemie GmbH	18030
Calciumchlorid-dihydrat, p. A. (CaCl ₂ · 2 H ₂ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG	5293
buffer solution pH = 4,00 (20°C) CertiPUR®	Merck Millipore von Merck KGaA	109435
buffer solution pH = 7,00 (20°C) CertiPUR®	Merck Millipore von Merck KGaA	109439
buffer solution pH = 9,00 (20°C) CertiPUR®	Merck Millipore von Merck KGaA	109461
CHAPS	Carl Roth GmbH + Co. KG	1479.4

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Cobaltchlorid-Hexahydrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Coenzym Q10	Sigma-Aldrich Co. LLC	C9538
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemie GmbH	27816
Cystein	Fluka Chemie GmbH	30089
Cytochrom- <i>c aus bovine heart</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC	C2037
D-(+)-Saccharose, p. A.	Carl Roth GmbH + Co. KG	4621.2
DEAE-Cellulose	Merck KGaA	3201.025
Decylubichinon	Santa Cruz Biotechnology	55486-00-5
Digitonin	AppliChem GmbH	A1905
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Fluka Chemie GmbH	60353
Dimethylsulfoxid, $\geq 99,5$ (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG	A994.2
Dinatriumhydrogenphosphat, p. A. (Na_2HPO_4)	Fluka Chemie GmbH	71642
D-Sorbit	Carl Roth GmbH + Co. KG	6213
Eisensulfat-Heptahydrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Essigsäure, 100%, p. A. (AcOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3738.5
Ethanol technisch (EtOH)	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Ethylendiamintetraessigsäure Tetranatriumsalz (EDTA)	Sigma-Aldrich Co. LLC	E6511
Formaldehyd (37 % in H_2O)	Sigma-Aldrich Co. LLC	252549
Glycerin, $\geq 98\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG	3783.2
Glycin, p. A.	Carl Roth GmbH + Co. KG	3908.2
HMW Native Marker Kit (HMW)	GE Healthcare	17-0445-01
Imidazol	Fluka Chemie GmbH	56750
Isopropanol	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Kaliumacetat	Fluka Chemie GmbH	60034
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG	6781.3
Kaliumcyanid, $\geq 98\%$ (KCN)	Fluka Chemie GmbH	60178
Kaliumdihydrogenphosphat, p. A. (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3904.1
Kaliumhexacyanidoferrat (III)	Sigma-Aldrich Co. LLC	244023
Kaliumhydroxid p. A. (KOH)	Fluka Chemie GmbH	60370
Kupfer-Sulfat-Pentahydrat, p. A. ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH + Co. KG	P024.1
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC	A4034
LMW-SDS Marker Kit (LMW)	GE Healthcare	17-0446-01
Luciferase-Luciferin-Kit	BioThema	144-041
Luminol	Fluka Chemie GmbH	9253
L- α -Phosphatidylcholin	Sigma-Aldrich Co. LLC	P2772
MagicMark TM Western Protein Standard	Invitrogen AG	LC5602
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p. A. ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH + Co. KG	A537.1

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, p. A. ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH + Co. KG	P027.2
Manganchlorid-Tetrahydrat, p. A. ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka Chemie GmbH	63543
Methanol technisch	Chemikalienausgabe FB Chemie	
N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin)	Sigma-Aldrich Co. LLC	T0377
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Co. LLC	T9281
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH + Co. KG	9105.4
Natriumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG	6779.1
Natriumazid, p. A. (NaN_3)	Sigma-Aldrich Co. LLC	S2002
Natriumbenzoat, p. A.	Carl Roth GmbH + Co. KG	8548.1
Natriumcarbonat, p. A. (Na_2CO_3)	Carl Roth GmbH + Co. KG	A135.2
Natriumchlorid, p. A. (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3957.1
Natriumcholat	Sigma-Aldrich Co. LLC	C1254
Natriumdesoxycholat, p. A.	Calbiochem	264103
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3904
Natriumdithionit	Fluka Chemie GmbH	71699
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG	2326.1
Natriumhydroxid, p. A. (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG	6771.1
Natriummolybdat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH + Co. KG	0274.1
Natriumoxalat	Merck KGaA	1.065.570.250
Natriumphosphat-Dodecahydrat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka Chemie GmbH	71909
Natriumsuccinat dibasisch Hexahydrat	Sigma-Aldrich Co. LLC	S2378
Natriumthiosulfat-Pentahydrat, p. A. ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA	65.160.500
n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	AppliChem GmbH	A6817
Nitrotetrazoliumblausäure, $\geq 98\%$ (NBT)	Carl Roth GmbH + Co. KG	4421.4
n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG)	AppliChem GmbH	A6813
p-Chlormercuribenzoessäure	Sigma-Aldrich Co. LLC	C4503
Pefabloc [®] SC	Fluka Chemie GmbH	76307
Pierce [®] Protein-free T20 (PBS) Blocking Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc	37573
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween [®] 20)	Carl Roth GmbH + Co. KG	9127.1
Ponceau S	Sigma-Aldrich Co. LLC	P3504
Protease-Inhibitor-Cocktail for Mammals (PIC_M)	Sigma-Aldrich Co. LLC	P8340
Protease-Inhibitor-Cocktail for Plants (PIC_P)	Sigma-Aldrich Co. LLC	P9599

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Pyrogallolrot, p. A.	Merck KGaA	L502634
Rotenon, 95-98%	Sigma-Aldrich Co. LLC	R8876
Roti [®] Nanoquant (5xKonzentrat)	Carl Roth GmbH + Co. KG	K880.1
Roti [®] -Block	Carl Roth GmbH + Co. KG	A151.2
Rotiphorese [®] Gel A	Carl Roth GmbH + Co. KG	3037.1
Rotiphorese [®] Gel A/B 29:1	Carl Roth GmbH + Co. KG	A515.1
Rotiphorese [®] Gel B	Carl Roth GmbH + Co. KG	3039.1
Salzsäure, rauchend, p. A. (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG	4625.1
Schwefelsäure 95%, p. A. (H ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG	4623.1
SERVA Blue G (Coomassie Brilliant Blue G-250)	SERVA Electrophoresis GmbH	35050
Silbernitrat, p. A. (AgNO ₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG	7908.2
Sypro [®] Ruby Protein Gel Stain	Invitrogen AG	S21900
Thimerosal	Sigma-Aldrich Co. LLC	T5125
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka Chemie GmbH	91701
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, p. A. (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG	4855.2
Triton X-100	Roche Diagnostics GmbH	789704
Trypsin Resuspension Dilution Buffer	Promega Corporation	V5111
Trypsin, lyophilised powder, sequencing grade	Promega Corporation	V5111
Valinomycin	Sigma-Aldrich Co. LLC	V0627
Wasserstoffperoxid, 30% (H ₂ O ₂)	Merck KGaA	107209
Zinksulfat-Heptyhydrat (ZnSO ₄ · 7 H ₂ O)	Merck KGaA	2695101
β-Mercaptoethanol, 99%, p. A.	Carl Roth GmbH + Co. KG	4227.1
β-Nicotinamadenindinukleotid, reduziert (NADH)	Sigma-Aldrich Co. LLC	N6005

3.2 Antikörper

Primäre Antikörper

Spezies	Protein	Abkürzung	Hersteller	Bestellnummer
			Proteintech	
Kaninchen	NDUFS1 (Komplex I)	rb-α-Ndufs1	Group, Inc	124444-1-AP
Maus	SDHA (Komplex II)	ms-α-SDHA	Abcam plc	ab14715
Maus	UQCRC2 (Komplex III)	ms-α-UQCRC2	Abcam plc	ab14745
Maus	MTCO1 (Komplex IV)	ms-α-MTCO1	Abcam plc	ab14705
Maus	OxPhos Complex V subunit alpha	ms-α-ATPA	Invitrogen	459240

Sekundäre Antikörper

Spezies	Konjugat	Antigen	Hersteller	Bestellnummer
Esel	IgG-HRP	α -Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc,	sc-2318
Esel	IgG-HRP	α -Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc,	sc-2033

3.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
100 μ l 8-Kanalpipette Research®	Eppendorf AG
300 μ l 8-Kanalpipette Research®	Eppendorf AG
Algenaufzuchtbecken	Mechanikwerkstatt des FB Chemie TU Darmstadt
Analoger Hin- und Her-Schüttler Typ 3016	Gesellschaft für Labortechnik (GFL)
Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik
D4000 <i>Distinction Water Still</i>	Stuart, Bibby Scientific Limited
Deckglas-Pinzetten (gerade und gebogen)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Dewar-Gefäß nach DIN 12492	KGW-Isotherm, Karlsruher Glastechnisches Werk-Schieder GmbH
<i>Electrophoresis Power Supply</i> EPS1001	Amersham pharmacia biotech Europe GmbH
<i>Electrophoresis Power Supply</i> EPS301	Amersham pharmacia biotech Europe GmbH
<i>Electrophoresis Power Supply</i> EPS600	Amersham pharmacia biotech Europe GmbH
<i>Electrophoresis Power Supply</i> EPS601	Amersham pharmacia biotech Europe GmbH
Elektroelutoren und Elektroelutionskammern	Mechanikwerkstatt des FB Chemie TU Darmstadt
EUROSTAR digital	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Feinwaage R 200 D	Sartorius AG
Festwinkelrotor # 7588	Heraeus Holding GmbH
Festwinkelrotor # 7593	Heraeus Holding GmbH
Festwinkelrotor F 34-6-38	Eppendorf AG
Festwinkelrotor F 45-30-11	Eppendorf AG
Festwinkelrotor GS3	Sorvall
Festwinkelrotor SS34	Sorvall
Festwinkelrotor Ti-70	Beckmann Coulter GmbH
Folienschweißgerät SFS 150 A1	SilverCrest®
Gelelektrophorese-Apparatur SE250 <i>Mighty Small II Deluxe Mini Vertical Electrophoresis Unit</i>	Hoefer Inc
Gelelektrophorese-Apparatur SE260 <i>Mighty Small II Deluxe Mini Vertical Electrophoresis Unit</i>	Hoefer Inc
Gelelektrophorese-Apparatur SE400 <i>Air-Cooled Vertical Electrophoresis Unit-Complete</i>	Hoefer Inc
Gelelektrophorese-Apparatur SE600X <i>Chroma Deluxe Dual Cooled Vertical Unit-Complete</i>	Hoefer Inc
Gelfärbeschalen MIDI, PP	Carl Roth GmbH + Co. KG

Bezeichnung	Hersteller
Gelfärbeschalen MINI, PP	Carl Roth GmbH + Co. KG
Gradientenmischer groß (Kammerdurchmesser 34 mm)	Mechanikwerkstatt des FB Chemie TU Darmstadt
Gradientenmischer klein (Kammerdurchmesser 19 mm)	Mechanikwerkstatt des FB Chemie TU Darmstadt
Gyrotory® <i>Water Bath Shaker</i> Modell G76	New Brunswick Scientific Co., Inc
Kanülen mit Luer-Lock-Anschluss 1,00x200 mm	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Kanülen mit Luer-Lock-Anschluss 1,50x100 mm	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Kühlgerät DLK 1002	Fryka Kältetechnik GmbH
Kühlgerät Julabo F30	Julabo GmbH
Lamin Air HLB 2448	Heraeus Holding GmbH
Lamin Air HLB 2472 BS	Heraeus Holding GmbH
Leuchttisch	Sarstedt AG & Co. KG
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm Holdings K.K.
Magnetrührer CUV-O-STIR® Modell 333	Hellma USA, Inc,
Magnetrührer IKAMAG® RET	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Magnetrührer RCT basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Magnetrührer RH basic 2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
MALDI-TOF/TOF MS Ultraflex I	Bruker EAS GmbH
Peristaltikpumpe Minipuls 3	Gilson, Inc
pH-Elektrode <i>BlueLine</i> 14 pH	Schott AG
pH-Meter CG842	Schott AG
PIPETMAN Classic™ P10	Gilson, Inc
PIPETMAN Classic™ P100	Gilson, Inc
PIPETMAN Classic™ P1000	Gilson, Inc
PIPETMAN Classic™ P2	Gilson, Inc
PIPETMAN Classic™ P20	Gilson, Inc
PIPETMAN Classic™ P200	Gilson, Inc
Quarzglas SUPRASIL® Küvette Typ 104F-QS	Hellma GmbH & Co. KG
Quarzglas SUPRASIL® Küvette Typ 109.004-QS	Hellma GmbH & Co. KG
Rotilabo®-Färbekammer MIDI, PMP	Carl Roth GmbH + Co. KG,
Rotilabo®-Färbekammer MINI, PMP	Carl Roth GmbH + Co. KG,
Rotilabo®-Signal-Timer mit Zeituhr	Carl Roth GmbH + Co. KG
Schwingrotor für Mikrotiterplatten A-2-DWP	Eppendorf AG
Simplicity™	Merck Millipore
Sonorex TK 52 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Sorvall RC-5B <i>Refrigerated Superspeed Centrifuge</i>	Sorvall
Spectrophotometer U-1100	Hitachi
Spectrophotometer UV-2102 PC	SHIMADZU
Spectrophotometer UV-2401 PC	SHIMADZU

Bezeichnung	Hersteller
THOMAPOR®-Dialyseschlauch	Reichert Chemietechnik GmbH & Co.
<i>tight-fit</i> Homogenisator (2 ml)	B. Braun Melsungen AG
<i>loose-fit</i> Homogenisator (30 ml)	B. Braun Melsungen AG
Tischzentrifuge Micro V	Fisher Scientific
Trans-Blot® SD <i>Semi-Dry Transfer Cell</i>	Bio-Rad Laboratories Inc
Ultrazentrifuge Optima™ LE 80K	Beckmann Coulter GmbH
UNIJET II <i>refrigerated aspirator vacuum pump</i>	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH
Universalwaage U 4100 S	Sartorius AG
Vertikalrotor VTi-50	Beckmann Coulter GmbH
ViewPix 900	biostep® GmbH
Vortexmischer Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Wasserbad RC 20	mgw Lauda
Wasserbad KWU R	mgw Lauda
Wasserbad Typ 1004	Gesellschaft für Labortechnik (GFL)
Wasserstrahlpumpe	Brand GmbH & Co. KG
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus Holding GmbH

3.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,2 ml Reaktionsgefäße mit flachem Deckel	Thermo Fisher Scientific Inc
1,5 ml Reaktionsgefäße	Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel e.K.
1,5 ml Reaktionsgefäße (Save-Lock)	Eppendorf AG
2,0 ml Reaktionsgefäße (Save-Lock)	Eppendorf AG
Bacillo® AF	Carl Roth GmbH + Co. KG
Cellstar® 15 ml konische Röhrchen, steril	Greiner Bio-One International AG
Cellstar® 50 ml konische Röhrchen mit Stehrand, steril	Greiner Bio-One International AG
Centricon® YM10, YM30-Konzentratoren	Amicon-Millipore
Centriprep® YM10, YM30, YM50-Konzentratoren	Amicon-Millipore
Cryoröhrchen mit Innengewinde und Dichtung, 2 ml, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG
CUTFIX <i>Stainless</i> Einmalskalpell #22	B. Braun Melsungen AG
Einmal-Pasteurpipetten mit dünner Spitze	Carl Roth GmbH + Co. KG
Einmal-Pasteurpipetten, graduert	Carl Roth GmbH + Co. KG
Faltenfilter 595 1/2, Ø 240 mm	Schleicher & Schuell
Gilson® Typ 1000 µl	Greiner Bio-One International AG
Gilson® Typ 200 µl	Greiner Bio-One International AG
Glaskugeln, Ø 425-600 µm	Carl Roth GmbH + Co. KG
GS-3-Zentrifugenbecher	Nalge Company
Hautstanze, 2 mm, steril	Miltex® GmbH
Kapillarspitzen XL, 10 µl	Biozym Scientific GmbH
Kimtech Precision wipes	Kimberly-Clark Professional
Membranfilter RC 55, Ø 47 mm, 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Membranfilter RC 58, Ø 50 mm, 0,2 µm	GE Healthcare, Whatman

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Nitrozellulosemembran Roti®-NC	Carl Roth GmbH + Co. KG
Omniitip™, 10 µl	ULPLAST Sp. z o.o.
OptiSeal™ Polypropylene Tubes for 36,2 mL	Beckmann Coulter GmbH
Papierhandtücher, grün, Cellulose	Tork Universal
Parafilm "M"	Pechiney Plastic Packing, Inc
Pipettenspitzen 10 µL	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen MultiFlex®-Tips, 10-200 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG
Pipettenspitzen ultratips 20-200 µL	Greiner Bio-One International AG
Pipettenspitzen ultratips 1000 µL	Greiner Bio-One International AG
Polycarbonate Tubes for Ti-70 with Cap Assembly, 26,3 mL	Beckmann Coulter GmbH
Prespotted AnchorChipTarget PAC II 384 HCCA	Eppendorf für Bruker EAS GmbH
Reagenzreservoir, PP, mit Deckel, für Mehrkanal-Pipetten	Brand GmbH & CO. KG
Rotilabo®-Blottingpapiere, 1,5 mm dick	Carl Roth GmbH + Co. KG
Rotilabo®-Einmalküvetten aus PMMA, Schichtdicke = 1 cm	Carl Roth GmbH + Co. KG
Rotiprotect®-Latex, puderfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG
Rotiprotect®-Nitril, puderfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG
Sekuroka®-Ärmelschoner Standard	Carl Roth GmbH + Co. KG
Sekuroka®-Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH + Co. KG
Sequi-Blot™ PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories, Inc
SS-34-Zentrifugenbecher	Nalge Company
Tygon-Schlauch R3607	VWR international
Tygon-Schlauch S3™ E-LFL	VWR international
WesternBright™ ChemiPen™	Advansta Corporation

3.5 Software

Software	Hersteller
Axio Vision Version 4.8.2	Carl Zeiss AG
ChemDraw® Version 9.0	CambridgeSoft
Compass 1.3	Bruker EAS GmbH
Corel Draw® Home & Student X7	Corel Corporation
Corel PHOTOPAINT® Home&Student X7	Corel Corporation
Delta2D Version 4.3	Decodon GmbH
Endnote X7	Adept Scientific
Foxit Reader Version 6.2.1.1224	Foxit Corporation
Image Reader LAS-3000 2.1	Fujifilm Holdings K.K.
MS Office 2007 Professional	Microsoft Corporation
Pdf Creator Version 1.7.0	pdfforge GmbH
ProteinScape 3.1	Bruker EAS GmbH
Real Statistics Resource Pack, Release 4.4	Charles Zaiontz, http://www.real-statistics.com/
UV Probe 1.11 & 2.1	SHIMADZU

3.6 Biologische Proben aus tierischem Gewebe

3.6.1 Herzproben aus Rind

Die Herzgewebeproben aus Rind stammen von unterschiedlichen Bezugsquellen. Erste Isolierungen von Mitochondrien wurden an Gewebe durchgeführt, dass seit November 2003 bei -80 °C gelagert wurde. Hierfür wird die Abkürzung BHM_{alt} (bovine heart mitochondria alt) verwendet. Für weitere Experimente wurde ein frisch geschlachtetes Rinderherz (BHM) vom Schlachthof Norbert Lulay GmbH (Am Schlachthof 7, 64625 Bensheim) geholt und am selben Tag eine Isolierung mit einem Teil des frischen Gewebes durchgeführt. Der Rest des Gewebes wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zu Testzwecken wurde ein Rinderherz bei einer Metzgerei in Darmstadt geholt. Laut Angabe des Metzgers handelte es sich um ein am Tag zuvor frisch geschlachtetes Herz, das ordnungsgemäß bei -20 °C gelagert wurde. Die aus diesem Gewebe isolierten Mitochondrien werden mit BHM_{FG} (falsch gelagert) bezeichnet.

Die Membranproteine aus Rinderherzmitochondrien wurden bereits von Schägger *et al.*^[86], Wittig *et al.*^[87] und Krause^[88] eingehend charakterisiert und dienen in unserer Arbeitsgruppe als Massen- und Aktivitätsstandard für die Proteine und Protein(super-)komplexe der oxidativen Phosphorylierung.

3.6.2 Herzproben aus Maus

Die Herzproben stammen von männlichen Mäusen der Spezies *Mus musculus*. Die Proben kommen aus Polen und wurden freundlicherweise von Dr. Katarzyna Kuter, Department of Neuropsychopharmacology, Institute of Pharmacology (Polish Academy of Sciences, Smętna 12, 31-343 Kraków, Poland) zur Verfügung gestellt. Bei den Mäusen handelt es sich um Labormäuse C57BC/6J (Charles River Laboratories Germany). Die Aufzucht der Tiere und die Entnahme der Proben wurden in Polen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Tötung (November 2014) waren die Tiere zwischen 2 und 3 Monaten alt und wurden täglich gefüttert (*ad libitum*). Nach der Präparation wurden das Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Überführung der Proben nach Deutschland erfolgte auf Trockeneis und die Lagerung in Darmstadt ebenfalls bei -80 °C.

3.6.3 Herzproben aus Ratte

3.6.3.1 Rattenherzmitochondrien Gruppe 1

Die in dieser Arbeit als Rattenherzmitochondrien Gruppe 1 (R_FHM; rat heart mitochondria 1) bezeichneten Proben stammen von männlichen Fischer-Ratten der Spezies *Rattus norvegicus*. Die Aufzucht der Labortiere F344/DuCrIj (Charles River Laboratories) und die Isolierung des Gewebes erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sataro Goto in Japan. Die Ratten waren zum Zeitpunkt der Tötung (Dezember 2008) 6,5 Monate alt und wurden *ad*

libitum gefüttert. Wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben, wurden die Proben direkt nach der Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren, auf Trockeneis nach Deutschland überführt und bis zur Isolierung der Mitochondrien bei -80 °C gelagert.

3.6.3.2 Rattenherzmitochondrien Gruppe 2

Die Rattenherzmitochondrien Gruppe 2 (R_{WHM}; rat heart mitochondria 2) stammen von männlichen Wistar-Ratten der Spezies *Rattus norvegicus*. Die Proben wurden von Dr. Katarzyna Kuter, Department of Neuropsychopharmacology in Polen, zur Verfügung gestellt. Die Labortiere Wistar Han, Strain Code: 273, wurden bei Charles Rivers Laboratories Germany käuflich erworben. Die Aufzucht, Tötung (Oktober 2014) und die Gewebeentnahme erfolgte in den Laboratorien in Polen. Die getöteten Tiere besaßen ein Alter zwischen 2 und 3 Monaten und wurden täglich gefüttert. Die Lagerung und der Transport erfolgte analog zu Abschnitt 3.6.3.1.

3.6.4 Herzproben aus Schwein

Ein frisch geschlachtetes Schweineherz wurde vom Schlachthof Norbert Lulay GmbH (Am Schlachthof 7, 64625 Bensheim) bei 4 °C geholt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Präparation des Gewebes wurde 8 Tage später durchgeführt.

3.6.5 Herzproben aus Wildschwein

Das Herzgewebe vom Wildschwein stammt aus dem Rheingaugebiet (Schnellstraße B260, 65396 Oberwalluf). Das Tier wurde früh morgens von einem Auto angefahren und schwer verletzt. Die Tötung erfolgte durch die zuständige Polizei, die Entnahme des Herzens wurde vor Ort von einem ortsansässigen Jäger vorgenommen. Das Gewebe wurde von der Masterstudentin Victoria Petermann an die TU Darmstadt bei 4 °C transportiert. Am selben Tag (01.08.2014) wurde von ihr eine Isolierung der Mitochondrien durchgeführt.

3.6.6 Herz- und Nierenprobe aus Reh

Das Herz- und Nierengewebe aus Reh wurde von Manfred Schröpfer, Revierförster Hessenforst Forstamt Langen, Gebiet Koberstadt, zur Verfügung gestellt. Der Transport bei 4 °C an die TU Darmstadt wurde von unserer Administrativ-Technischen Mitarbeiterin Christine Schröpfer durchgeführt. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Isolierung bei -80 °C gelagert.

3.6.7 Aufstellung der verwendeten Proben

Die Isolierung der Mitochondrien aus den Geweben wurde von mir oder unter meiner Anleitung von Olga Ankudin^[89] oder Victoria Petermann^[90] im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt (Tabelle 3.1). Bei den Proben von Ratte und Maus wurden jeweils gepoolte

Proben für die Präparation verwendet. Bei Maus wurden 7 Herzen mit einem Gewicht zwischen 100 und 200 mg, bei Ratte jeweils 3 Herzen mit einem Gewicht zwischen 800 und 900 mg eingesetzt.

Tabelle 3.1: Gewebeproben für die Isolierung von Mitochondrien, Präp. steht für Präparation durchgeführt von Olga Ankudin (OA), Victoria Petermann (VP) oder Sven-Hendric Marx (SHM). Bei den Proben von Ratte und Maus handelt es sich um **gepoolte Proben** (^P), Maus 7 Herzen, Ratte jeweils 3 Herzen) und es wurde nur das Gesamtgewicht angegeben.

Gewebe	Organismus	Sterbedatum	Gewicht [g]	Geschlecht	Abkürzung	Präp.
Herz	Rind	06.06.2014	48,35	männlich	BHM	SHM
Herz	Rind	28.04.2014	42,17	männlich	BHM _{FG}	SHM
Herz	Rind	Nov. 2003	39,07	unbekannt	BHM _{alt}	VP
Herz	Schwein	30.04.2014	56,66	unbekannt	PHM	VP
Herz	Wildschwein	01.08.2014	57,73	weiblich	WHM	VP
Herz	Reh	01.08.2014	49,58	weiblich	DHM	OA
Herz	Ratte (Fischer)	16.12.2008	2,62 ^P	männlich	R _F HM	VP
Herz	Ratte (Wistar)	23.09.2014	2,45 ^P	männlich	R _W HM	VP
Herz	Maus	20.10.2014	1,14 ^P	männlich	MHM	OA
Niere	Reh	01.08.2014	42,01	weiblich	DKM	OA

3.7 Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Mutante cw15 der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gearbeitet, zur Verfügung gestellt von der Sammlung für Algenkulturen in Göttingen (SAG 83.81). Diese Alge besitzt eine hohe metabolische Vielseitigkeit und ist daher in der Lage unterschiedliche Kohlenstoffquellen für das Wachstum zu nutzen^[91]. Die Anzucht in einem Medium mit einer hohen Konzentration an Mineralsalzen (HS-Medium) wird als photoautotrophes Wachstum bezeichnet. Hierbei nutzt die Alge Licht und Kohlenstoffdioxid aus der Luft für die Synthese von komplexen organischen Molekülen. Zusätzlich kann als Kohlenstoffquelle auch Acetat im Anzuchtmedium (TAP-Medium) dienen, hierbei handelt es sich um photomixotrophes Wachstum^[92].

Tabelle 3.2: Übersicht der mitochondrialen Präparationen von *C. reinhardtii*. Präp. steht für Präparation durchgeführt von Daniela Goedderz (DG) oder Sven-Hendric Marx (SHM).

Datum	Anzuchtart	Bezeichnung	Anzuchttemperatur [°C]	Präp.
03.06.2013	photomixotroph	M1P ₂₂	22	SHM
10.06.2013		M2P ₂₈	28	DG
05.08.2013		M5P ₃₁	31	DG
09.09.2013		M6P ₃₄	34	SHM
02.07.2013	photoautotroph	M4P ₂₂	22	DG
02.10.2013		M7P ₂₈	28	SHM

4 Methoden

4.1 Isolierung von Mitochondrien aus tierischem Gewebe

Die Isolierung von Mitochondrien aus tierischem Gewebe beruht auf dem Protokoll von Smith *et al.*^[93] und wird nach einer modifizierten Variante nach Reifschneider^[94] und Thilmany^[95] durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mitochondrien aus Herzmuskelgewebe von Rind, Reh, Schwein, Wildschwein, Maus, Ratte und aus Nierengewebe von Reh isoliert. Die Präparationen wurden von mir oder unter meiner Anleitung von den Masterstudenten Olga Ankudin und Victoria Petermann durchgeführt.

Die für die Isolierungen verwendeten Gewebe entstammen den in Abschnitt 3.6 bezeichneten Bezugsquellen und wurden kontinuierlich bei -80 °C gelagert. Um die Proteine vor Wärme, zu schützen werden alle Homogenisierungs- und Zentrifugationsschritte bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Geräte und Puffer, die hierfür verwendet werden, müssen vorgekühlt sein. Für die Herzgewebeproben von Rind, Schwein, Wildschwein und Reh wird die Vorschrift A in Abschnitt 4.1.1, für die Proben aus Maus und Ratte die Vorschrift B in Abschnitt 4.1.2 verwendet. Da bei den Geweben von Maus und Ratte die Menge an Gewebe deutlich niedriger war als bei den anderen Proben, musste das Protokoll zur Isolierung angepasst werden.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der für die Mitochondrienisolierung aus Geweben verwendeten Puffer

Saccharose-Lösung A		Saccharose-Lösung B	
250,0 mM	Saccharose	250,0 mM	Saccharose
10,0 mM	Tris	2,0 mM	Tris
0,5 mM	Pefablock® SC	1,0 mM	Succinat
in dest. H ₂ O, pH 7,8 mit HCl einstellen		0,2 mM	EDTA
4,0 mM	Cystein	0,5 mM	Pefablock® SC
		in dest. H ₂ O, pH 7,8 mit HCl einstellen	

4.1.1 Isolierung von Mitochondrien aus Herzmuskelgewebe A

Es werden 50 g des tiefgefrorenen Herzgewebes bei 4 °C aufgetaut und mit einem Skalpell in kleine Stücke von ca. 0,5 x 0,5 cm² geschnitten. Anschließend werden 67 mL Saccharose-Lösung A (Tabelle 4.1) hinzugegeben und mit einem Haushaltsmixer homogenisiert. Danach wird bei dem Homogenisat mit 2,0 M Tris-Lösung ein pH-Wert von 7,5 eingestellt und in Nylongaze (Maschendurchmesser 20 µm) überführt. Nach Entfernung der Flüssigkeit werden die Gewebsstücke in 150 mL Saccharose-Lösung B (Tabelle 4.1) resuspendiert. Um die intakten Zellen aufzuschließen werden je 20 mL der Suspension mit einem Teflon-Glas Homogenisator (2000 rpm, 5 Hube, *loose-fit*) zerkleinert. Anschließend muss der pH-Wert erneut mit einer 2,0 M Tris-Lösung auf 7,5 eingestellt werden. Das Entfernen von nicht homogenisiertem Muskelgewebe und anderen Zellbestandteilen erfolgt durch eine Zentrifugation bei 1200 × g, 2600 rpm, 20 Minuten und 4 °C (Sorvall RC-5B, GS3-

Rotor). Der Überstand, welcher intakte Mitochondrien enthält, wird vorsichtig dekantiert und falls notwendig wird der pH-Wert erneut mit der Tris-Lösung auf pH 7,5 eingestellt. Die Lösung wird anschließend bei $26000 \times g$, 14700 rpm, 20 Minuten und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (SS34-Rotor) zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird verworfen und das Mitochondrien enthaltende Pellet wird in ca. 600 μL Saccharose-Lösung B resuspendiert. Zur Lagerung wird die Lösung zu Portionen von je 100 μL aliquotiert, anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.1.2 Isolierung von Mitochondrien aus Herzmuskelgewebe B

Für die Isolierung von Mitochondrien aus Mäuseherz und Rattenherz muss aufgrund der geringeren Masse (ca. 100-900 mg pro Herz) die Präparation angepasst werden. Das Gewebe von mehreren Herzen (Maus: 7; Ratte: 3) wird mit einem Skalpell zerkleinert und direkt mit 10 mL Saccharose-Lösung B versetzt. Nach einer Inkubation für 10 Minuten wird das Gemisch mit einem Teflon-Glas Homogenisator (900 rpm, 10 Hübe, *tight-fit*) zerkleinert. Anschließend wird der pH-Wert mit einer 2,0 M Tris-Lösung auf pH 7,5 eingestellt und bei $1200 \times g$, 3200 rpm, 5 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sorvall RC-5B, SS34-Rotor) zentrifugiert. Um die Ausbeute an Mitochondrien zu erhöhen, wird das erhaltene Pellet in 9 mL Saccharose-Lösung B resuspendiert und für 5 Minuten bei $1500 \times g$, 3600 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (SS34-Rotor) zentrifugiert. Dieser Schritt wird zweimal wiederholt. Anschließend werden die Überstände vereinigt und bei $26000 \times g$, 14700 rpm, 20 Minuten und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (SS34-Rotor) zentrifugiert. Nun wird das erhaltene Pellet in 1 mL Saccharose-Lösung B resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.1.3 Isolierung von Mitochondrien aus Rehnieren

Es werden 50 g der tiefgefrorenen Rehnieren bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut, mit einem Skalpell zerkleinert und 70 mL Saccharose-Lösung A hinzugegeben. Nach der Homogenisierung mit einem Handmixer erhält man eine sehr feine Suspension, die im Anschluss bei $26000 \times g$, 14270 rpm, 20 Minuten und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sorvall RC-5B, SS34-Rotor) zentrifugiert wird. Im Gegensatz zu der Isolierung von Mitochondrien aus Herzmuskelgewebe muss der pH-Wert der Lösung nicht eingestellt werden, und bleibt bei allen Arbeitsschritten in einem Bereich von pH 7 - 7,5. Nach Resuspendieren des erhaltenen Pellets in 120 mL Saccharose B wird das Gewebe mit einem Teflon-Glas Homogenisator (2000 rpm, 5 Hübe, *loose-fit*) zerkleinert. Anschließend wird bei $1200 \times g$, 2600 rpm, 40 Minuten und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (GS3-Rotor) zentrifugiert. Um die im Überstand enthaltenen Mitochondrien zu pelletieren wird bei $26000 \times g$, 14700 rpm, 20 Minuten und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (SS34-Rotor) zentrifugiert. Im Anschluss wird in 1 mL Saccharose-Lösung B resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.2 Anzucht von *Chlamydomonas reinhardtii*-Kulturen

Vorkulturen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Mutante cw15, SAG 83.81) werden je in 100 mL Anzuchtmedium, HS- oder TAP-Medium (Tabelle 4.2, 4.3) versetzt mit 100 µL Ampicillin, unter Dauerbelichtung bei 22 °C angezogen. Die Zugabe des Antibiotikums Ampicillin soll eine Kontamination der Kulturen mit Bakterien oder Pilzen verhindern. Um einem Absetzen der Zellen entgegenzuwirken, werden die Erlenmeyerkolben mit 60 rpm geschüttelt. Des Weiteren sind die Flaschen mit luftdurchlässigem Gazestopfen verschlossen. Die Anzucht im präparativen Maßstab erfolgt nach dem Protokoll von Meyer zu Tittingdorf *et al.*^[9, 96]. Es werden 25 mL einer Vorkultur zu 5 L des entsprechenden Kulturmediums in einer Anzuchtflasche gegeben. Um eine Kontaminierung zu vermeiden, müssen Medium und Flasche vorher über Nacht autoklaviert werden. Die Öffnung der Flasche ist mit einem Gummistopfen mit Belüftungsröhren versehen, die zur Begasung der Algen mit Luftsauerstoff mit 90 L h⁻¹ durch einen Kompressor genutzt werden. Die Belichtung der Kultur erfolgt in einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus mittels seitlich angebrachter Leuchtstoffröhren (Osram L18 W/25, Universal weiß) mit einer Lichtintensität von 250 µmol Photonen m⁻² s⁻¹. Des Weiteren wird die Temperatur des Anzuchtmediums über ein thermostatisierbares Wasserbad eingestellt. Die Ernte von *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgt jeweils nach 4 Tagen.

Tabelle 4.2: Mediumzusammensetzung für photoautotrophe Anzucht

Sueoka High-Salt (HS) Medium		Beijerinck's Lösung	
5 mL L ⁻¹	Beijerinck's Lösung	1,87 M	NH ₄ Cl
5 mL L ⁻¹	Phosphatlösung	16 mM	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
1 mL L ⁻¹	Hutner-Spurenelemente	14 mM	CaCl ₂ · 2 H ₂ O

Tabelle 4.3: Mediumzusammensetzung für photomixotrophe Anzucht

Tris-Acetat-Phosphat (TAP)-Medium		TAP-Salze	
2,42 g L ⁻¹	Tris	280 mM	NH ₄ Cl
1 g L ⁻¹	Natriumacetat	16 mM	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
25 mL L ⁻¹	TAP-Salze	14 mM	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
375 mL L ⁻¹	Phosphatlösung		
in dest. H ₂ O, pH 7,0 mit Essigsäure einstellen			
1 mL L ⁻¹	Hutner-Spurenelemente		

Tabelle 4.4: Zusammensetzung der Hutner-Spurenelemente und der Phosphatlösung

Hutner-Spurenelemente		Phosphatlösung	
50,00 g L ⁻¹	EDTA	1,262 M	K ₂ HPO ₄
22,00 g L ⁻¹	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1,058 M	KH ₂ PO ₄
11,40 g L ⁻¹	H ₃ BO ₃		
5,06 g L ⁻¹	MnCl ₂ · 4 H ₂ O		
1,61 g L ⁻¹	CoCl ₂ · 6 H ₂ O		
1,57 g L ⁻¹	CuSO ₄ · 5 H ₂ O		
1,10 g L ⁻¹	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O		
4,99 g L ⁻¹	FeSO ₄ · 7 H ₂ O		

4.2.1 Aufschluss der Zellen und Isolierung der Chloroplasten und Mitochondrien

Da die Mutante cw15 der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* keine intakten Zellwände besitzt erfolgt der Aufschluss unter relativ milden Bedingungen durch starkes Schütteln mit Glaskugeln^[97]. Die Chloroplasten und Mitochondrien werden im Gegensatz zu anderen Methoden des Zellaufschlusses daher größtenteils intakt erhalten.

Die Kultur wird gleichmäßig auf Zentrifugenbecher verteilt und bei 2700 × g, 4800 rpm, 10 Minuten und 4 °C (Sorvall RC-5B, GS3-Rotor) zentrifugiert. Anschließend wird der klare Überstand verworfen und das Sediment, welches noch intakte Zellen enthält, wird mit 5 mL Aufschluss-Puffer resuspendiert (Tabelle 4.5). Die Suspension wird zum doppelten Volumen an Glaskugeln (10 mL, Ø 425 – 600 µm) gegeben. Durch starkes Schütteln des Suspension-Glaskugel-Gemisches auf einem Vortexmischer bei maximaler Leistung für 1 Minute erfolgt der mechanische Aufschluss der Zellen. Dann wird die Organellen-Suspension mittels einer schräg abgeschnittenen, dünnen Pasteurpipette von den Glaskugeln abgesaugt und in eines neues Gefäß überführt. Die Reinigung der Glasperlen erfolgt zunächst mit Ethanol, dann mit Aceton und abschließend mit dest. Wasser. Nach Trocknung der Glasperlen in einem Trockenschrank bei 60 °C für mehrere Tage können diese wieder verwendet werden.

Um die Chloroplasten aus dem Organellengemisch zu erhalten, wird die Suspension zweimal für je 3 Minuten bei 2000 × g, 4100 rpm und 4 °C (SS34-Rotor) zentrifugiert. Das erhaltene Sediment, welches hauptsächlich Chloroplasten und als Verunreinigung Mitochondrien enthält, wird in 300 µL Aufschluss-Puffer resuspendiert. Anschließend wird die Chloroplasten-Lösung mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Um ein Maß für den Proteingehalt zu erhalten, wird eine Chlorophyllbestimmung (Abschnitt 4.2.1.1) durchgeführt.

Im Überstand der Präparation befinden sich die Mitochondrien, welche mit Chloroplasten verunreinigt sind. Um diese Verunreinigung zu verringern, wird der Überstand zweimal für je 5 Minuten bei 2000 × g, 4100 rpm und 4 °C (SS34-Rotor) zentrifugiert. Das erhaltenen Pellet wird verworfen und der Überstand für 40 Minuten bei 10000 × g, 9100 rpm und 4 °C (SS34-

Rotor) zentrifugiert. Das Sediment, welches eine angereicherte Fraktion an Mitochondrien enthält, wird in 300 µL Aufschluss-Puffer resuspendiert. Anschließend wird die Mitochondrien-Lösung mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Hier wird ebenfalls eine Chlorophyllbestimmung durchgeführt.

Tabelle 4.5: Zusammensetzung des Aufschluss-Puffers

Aufschluss-Puffer	
250 mM	D-Sorbit
1 mM	MnCl ₂ · 4 H ₂ O
10 mM	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
40 mM	Tris
in dest. H ₂ O, pH 7,0 mit Salzsäure einstellen	
1 µL mL ⁻¹	Protease-Inhibitor-Cocktail for Plants (PIC_P)
0,01 % (w/v)	BSA
10 mM	DTT (frisch zugeben)

4.2.1.1 Chlorophyllbestimmung

Für die Chlorophyllbestimmung werden 40 µL der Thylakoidmembran-Suspension zu 10 mL 80 %igem (v/v) Aceton (Verdünnungsfaktor 250) gegeben, für 2 Minuten gerührt und anschließend filtriert. Dann wird die Absorption des Filtrats bei $\lambda = 647$ nm, $\lambda = 664$ nm und $\lambda = 750$ nm mittels eines Spektralphotometers gemessen. Die Chlorophyllkonzentration kann mit der Formel nach Porra^[98] ermittelt werden:

$$\text{Chlorophyll } a + b = (17,76 \cdot (A_{647 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) + 7,34 \cdot (A_{664 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}})) \cdot VF \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right]$$

4.3 Isolierung der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat

Die Isolierung der Chloroplasten-ATP-Synthase erfolgt nach der Präparation, die ich in meiner Diplomarbeit^[99] ausführlich beschrieben habe. Während der durchgeführten Isolierungen hat sich gezeigt, dass eine erhöhte Menge an ATP und Natriumcholat im Solubilisierungs-Puffer B3 zu einer höheren Ausbeute an ATP-Synthase führen. Die angepasste Zusammensetzung dieses Puffers ist in der folgenden Tabelle gezeigt:

Tabelle 4.6: Zusammensetzung des Solubilisierungs-Puffers B3

Solubilisierungs-Puffer B3	
400 mM	Saccharose
20 mM	Tricin
5 mM	MgCl ₂
400 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
40 mM	Octyl β-D-glucopyranosid (OG)
400 μM	Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP)
23 mM	Natriumcholat
in dest. H ₂ O, pH mit NaOH auf 8,0 einstellen	
50 mM	DTT

4.4 Proteinbestimmung

4.4.1 Bradford

Die Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford^[100] beruht auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 (Abbildung 4.1) an hydrophobe und kationische Seitenketten von Proteinen. Aufgrund dieser Anlagerung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von $\lambda = 450 \text{ nm}$ nach $\lambda = 590 \text{ nm}$. Diese Zunahme bei $\lambda = 590 \text{ nm}$ ist näherungsweise proportional zum Proteingehalt der zu untersuchenden Probe. Nach Zor und Selinger^[101] wird die Genauigkeit dieses Verfahrens durch Auftragung des Quotienten $A_{590 \text{ nm}}/A_{450 \text{ nm}}$ gegen die Proteinmenge deutlich erhöht.

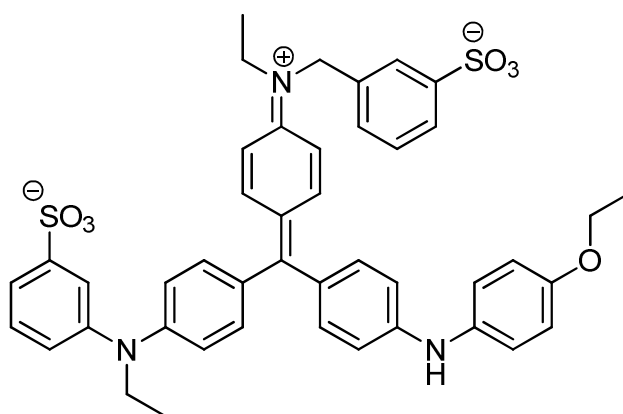


Abbildung 4.1: Strukturformel von Coomassie Brilliant Blue G-250, nach Diezel *et al.*^[102]

In dieser Arbeit wird Roti[®] Nanoquant von Carl Roth verwendet. Die Nachweisgrenze wird laut Hersteller mit 200 ng pro mL gemessener Probe angegeben. Zur Erstellung einer Standardreihe wird Rinderserum Albumin (BSA), 1 mg mL^{-1} , verwendet. Folgende Verdünnungen von BSA werden vorbereitet: 100, 85, 70, 55, 40, 30, 20, 10, 5, 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Das Probenvolumen für die Standardreihe und die zu untersuchende Proteinlösung beträgt jeweils 200 μL . Nun werden jeweils 800 μL Roti[®] Nanoquant (5x Konzentrat, 4 Teile dest. H_2O mit einem Teil Konzentrat) hinzugegeben und für 10 Minuten bei RT inkubiert.

Anschließend werden die Proben in Einmal-Halbmikroküvetten aus PMMA gegeben und die Absorption bei oben genannten Wellenlängen bestimmt. Als Referenzprobe wird dest. H_2O verwendet.

4.4.2 Pyrogallolrot

Die Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Pyrogallolrot (Abbildung 4.2) beruht auf der Anlagerung eines Pyrogallolrot-Molybdat-Komplexes^[103, 104] an Proteine unter sauren Bedingungen. Aufgrund dieser Anlagerung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von $\lambda = 470 \text{ nm}$ nach $\lambda = 600 \text{ nm}$. Auch hier besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorptionszunahme bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ und dem Proteingehalt in

Lösung. Im Gegensatz zur Bradford-Methode besitzt dieses Verfahren einen größeren dynamischen Bereich von 10 µg bis 16 mg mL⁻¹.

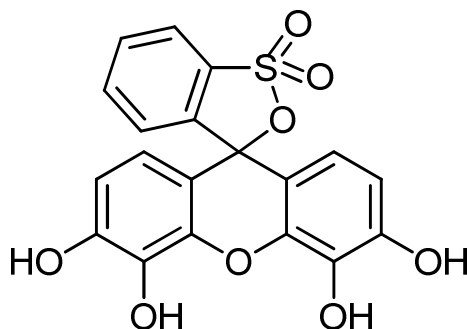


Abbildung 4.2: Strukturformel von Pyrogallolrot, nach Hadwiger *et al.*^[105]

Zur Erstellung einer Standardreihe wird Rinderserum Albumin (BSA), 1 mg mL⁻¹, verwendet. Die Verdünnungen der Standardreihe entsprechen den in Abschnitt 4.4.1 genannten. Das Probenvolumen für die Standardreihe und die zu untersuchende Proteinlösung beträgt jeweils 20 µL. Nun werden jeweils 1,25 mL der Lösung D (Tabelle 4.7) hinzugegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Die weitere Vorgehensweise ist identisch mit der in Abschnitt 4.4.1.

Tabelle 4.7: Zusammensetzung der Lösungen für die Proteinbestimmung nach der Pyrogallolrot-Methode

Lösung A		Lösung B	
1,5 mM	Pyrogallolrot in Methanol	10 mM	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O
Lösung C		Lösung D	
24,2 mM	Natriumsuccinat · 6 H ₂ O	4,0 % (v/v)	Lösung A
1,16 mM	Natriumoxalat	0,4 % (v/v)	Lösung B
3,86 mM	Natriumbenzoat	90,0 % (v/v)	Lösung C
		in dest. H ₂ O, pH 2,5 mit HCl einstellen	

4.4.3 Lowry

Bei der Methode zur Proteinbestimmung nach Lowry^[106] laufen verschiedene Redoxreaktion ab. Zunächst bildet sich in alkalischer Lösung ein Chelatkomplex zwischen dem Peptidgerüst des Proteins und Kupfer-Ionen aus. Sind Tyrosinreste vorhanden, tragen diese auch zur Komplexierung^[107] bei. Die Cu²⁺-Ionen werden zu Cu⁺ reduziert, das dann Molybdat und Wolframat, die in Form von Heteropolyphosphorsäuren (Folin-Ciocalteu-Reagenz) vorliegen, reduziert^[108]. Das dabei gebildete Produkt besitzt eine tiefblaue Färbung und kann spektralphotometrisch bei λ = 740 nm gemessen werden. Wie auch bei den anderen Verfahren zur Proteinbestimmung besteht zwischen der Zunahme der Absorption und dem Proteingehalt der Lösung ein linearer Zusammenhang. Da dieser Test anfällig gegenüber Detergenzien ist,

wird die Variante nach Peterson^[109] durchgeführt. Hierbei ist der erste Schritt eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) und Natriumdesoxycholat (DOC).

Zur Erstellung einer Standardreihe wird Rinderserum Albumin (BSA), 1 mg mL^{-1} , verwendet. Die Verdünnungen der Standardreihe entsprechen den in Abschnitt 4.4.1 genannten. Die Proben werden mit dest. H_2O auf 1 mL aufgefüllt und mit $0,15 \text{ \% (w/v)}$ DOC-Lösung versetzt. Nach 10 Minuten werden $100 \text{ }\mu\text{L}$ einer $72,0 \text{ \% (w/v)}$ TCA-Lösung dazugegeben und kräftig geschüttelt. Dann wird die Reaktionsmischung für 15 Minuten bei $5000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend werden die Sedimente für 1 Stunde bei RT getrocknet.

Im Anschluss an das Resuspendieren in $500 \text{ }\mu\text{L}$ $2,5 \text{ \% (w/v)}$ SDS-Lösung werden $500 \text{ }\mu\text{L}$ Lösung A (Tabelle 4.8) hinzugegeben und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nun werden $250 \text{ }\mu\text{L}$ $6,25 \text{ \% (v/v)}$ Folin-Ciocalteu-Reagenz hinzugegeben und es erfolgt eine Inkubation bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 Minuten. Idealerweise sollte aufgrund von unterschiedlichen Proteinmengen eine Abstufung der Blaufärbung zu erkennen sein. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur werden die Proben im Spektralphotometer bei $\lambda = 740 \text{ nm}$ gemessen.

Die weitere Vorgehensweise ist identisch mit der in Abschnitt 4.4.1.

Tabelle 4.8: Zusammensetzung der Lösungen für die Proteinbestimmung nach Lowy

Lösung A	
0,025 % (w/v)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$
0,05 % (w/v)	Natriumtartrat
2,38 % (w/v)	Na_2CO_3 ; gelöst in $0,2 \text{ M NaOH}$

4.5 Solubilisierung von Membranproteinen

Um Membranproteine aus ihrer Lipiddoppelschicht herauszulösen (solubilisieren), müssen Detergenzien verwendet werden. In dieser Arbeit wird für die Solubilisierung von Membranproteinen das milde nicht-ionische Detergens Digitonin eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein Steroid-Glycosid (Abbildung 4.3), welches aus den Samen des Fingerhuts *Digitalis purpurea* extrahiert wird.

Aufgrund der Solubilisierung mit diesem milden Detergens^[110] bleiben die Protein-Protein-Interaktionen und supramolekulare Strukturen, wie z.B. Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung, erhalten.

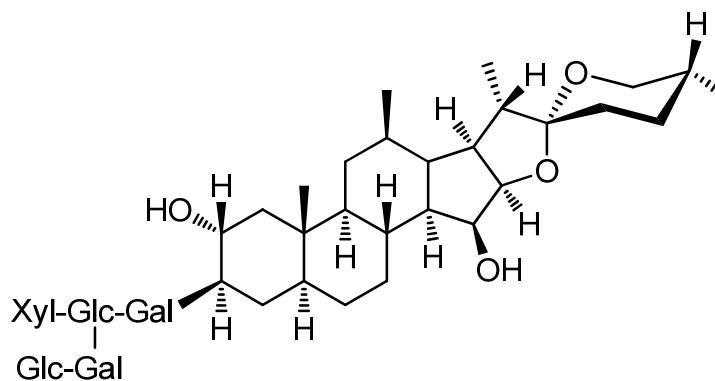


Abbildung 4.3: Strukturformel von Digitonin, nach Muhr *et al.*^[111]

4.5.1 Solubilisierung von Mitochondrien aus tierischem Gewebe

Die bei -80 °C gelagerte Mitochondrienprobe wird auf Eis aufgetaut und es wird ein Pufferwechsel durchgeführt. Nach Zugabe von 300 µL 1×Solubilisierungspuffer M (2×Solubilisierungspuffer M, Tabelle 4.9, verdünnt mit dest. H₂O) wird die Suspension für 8 Minuten bei 4 °C und 20800 × g, 14700 rpm (Eppendorf 5804R, Rotor: F 45-30-11) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in dem vorher berechneten Volumen Puffermix resuspendiert. Dann wird die entsprechende Menge einer 10 %igen (w/v) Digitonin-Stammlösung (Beispielrechnung Abbildung 4.4) hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1 % Digitonin im Probenvolumen erreicht wird. Anschließend wird der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dazwischen wird die Probe alle 10 Minuten durch Vortexen gut durchmischt. Danach folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 4 °C und 20800 × g, 14700 rpm (Rotor: F 45-30-11). Der Überstand, der die solubilisierten Proteine enthält, wird in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt.

Für die Solubilisierung von Rinderherzmitochondrien wurde bereits von Krause^[88] das optimale Digitonin zu Protein-Verhältnis von 3 g Digitonin pro 1 g Protein (3 g/g) ermittelt. Olga Ankudin^[89] und Victoria Petermann^[90] haben im Rahmen ihrer Masterarbeit unter meiner Anleitung folgende optimalen Verhältnisse für die mitochondrialen Proben ermittelt: Schweineherz, Wildschweinherz, Rattenherz (Fisher und Wistar), Rehherz und Rehnier: 3g/g; Mäuseherz: 4 g/g

1 g/g	↓·3	1 µL/100 µg	10 % (w/v) Digitonin-Stammlösung
1 g/g	↓·3	3 µL/300 µg	10 % (w/v) Digitonin-Stammlösung
3 g/g	↓·10	9 µL/300 µg	10 % (w/v) Digitonin-Stammlösung
3 g/g		90 µL/300 µg	1 % (w/v) Digitonin- Lösung
⇒ 81 µL Puffermix + 9 µL 10 % (w/v) Digitonin-Stammlösung			

Abbildung 4.4: Beispielrechnung für eine Solubilisierung mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g für eine Proteinmenge von 300 µg

Tabelle 4.9: Zusammensetzung der Puffer für die Solubilisierung von mitochondrialen Proteinen

2×Solubilisierungspuffer M		Puffermix	
60 mM	HEPES	500 µL	2×Solubilisierungspuffer M
300 mM	Kaliumacetat	5 µL	Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC_M)
20,0 % (v/v)	Glycerin	395 µL	dest. H ₂ O
in dest. H ₂ O, pH 7,4 mit KOH einstellen			

4.5.2 Solubilisierung von Mitochondrien aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die bei -80 °C gelagerte Mitochondrienprobe wird auf Eis aufgetaut und es werden 100 µL 10 %ige Digitonin-Stammlösung und 500 µL 2× Solubilisierungspuffer P hinzugegeben. Nach gutem Mischen des Ansatzes erfolgt eine 30 minütige Inkubation bei 4 °C, dazwischen wird die Probe alle 10 Minuten durch Vortexen gut durchmischt. Anschließend wird für 40 Minuten bei 4 °C und 20800 × g, 14700 rpm (Eppendorf 5804R, rotor: F 45-30-11) zentrifugiert. Hierbei findet eine Abtrennung der Membranrümpfer sowie des nicht solubilisierten Materials statt. Der Überstand wird in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. In Tabelle 4.10 ist beispielhaft ein Solubilisierungsansatz mit einer Chlorophyllkonzentration von 0,25 mg mL⁻¹ dargestellt. Im Gegensatz zu der Solubilisierung von mitochondrialen Proteinen aus tierischem Gewebe muss bei der Alge *C. reinhardtii* ein deutlich höheres Digitonin/Protein-Verhältnis von 40 g/g gewählt werden^[83].

Tabelle 4.10: Zusammensetzung der Puffer für die Solubilisierung von mitochondrialen Proteinen aus *C. reinhardtii*

2×Solubilisierungspuffer P		Solubilisierungsansatz für <i>C. reinhardtii</i>	
10 mM	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	500 µL	2×Solubilisierungspuffer P
10 mM	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	400 µL	Thylakoidmembran (0,625 mg mL ⁻¹)
40 mM	Tricin	100 µL	10 % (w/v) Digitonin-Stammlösung
500 mM	6-Aminohexansäure		
20 % (w/v)	Glycerin		
in dest. H ₂ O, pH 8,0 mit NaOH einstellen			
10 mM	DTT		

4.6 Gelelektrophoretische Trennverfahren

Polyacrylamid-Gele (PA-Gele) werden in der Biochemie zur Reinigung, Trennung und Analyse von Proteine eingesetzt. Polyacrylamid entsteht durch Kopolymerisation von Acrylamid mit dem Quervernetzer *N,N'*-Methylenbisacrylamid^[107]. Die radikalische Polymerisation wird durch *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert und durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) initiiert. Die Porengroße der Polyacrylamid-Matrix wird durch zwei Größen festgelegt, die Totalacrylamidkonzentration *T* in % (w/w) und den Quervernetzungsgrad *C* in % (w/v). Diese Parameter sind in den folgenden Gleichungen dargestellt:

$$T = \frac{\text{Gramm}_{\text{Acrylamid}} + \text{Gramm}_{\text{Quervernetzer}}}{\text{mL}_{\text{Lösung}}} [\%]$$

$$C = \frac{\text{Gramm}_{\text{Quervernetzer}}}{\text{Gramm}_{\text{Acrylamid}} + \text{Gramm}_{\text{Quervernetzer}}} [\%]$$

4.6.1 Blau-native Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die Blau-native Gelelektrophorese ermöglicht eine native Auftrennung von Proteinen, Proteinkomplexen und -superkomplexen^[112]. Der anionische Farbstoff Coomassie Brilliant Blau (Serva Brilliant Blue G-250), welcher im Kathodenpuffer enthalten ist, lagert sich an hydrophobe und kationische Aminosäuren an (Abschnitt 4.4.1) und maskiert so die Eigenladung der Proteine. Dabei wird die native Struktur der Proteine und ihre enzymatische Aktivität nicht verändert und sie wandern aufgrund der negativen Ladung zur Anode. Während dieser Wanderung sorgt der Siebeffekt der PA-Gelmatrix für eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse^[113, 114]. In der Regel handelt es sich bei BN-Gele um Gradienten-Gele mit einem Trennungsbereich von 100 kDa bis 10 MDa.

In dieser Arbeit werden große Bis-Tris BN-Gele mit einer Abmessung von 16 cm x 18 cm und mittlere Gele mit 10 cm x 10 cm jeweils mit einer Dicke von 1,5 mm hergestellt. Es wird ein Gradient mit einer Totalacrylamidkonzentration von *T* = 4 % bis 13 % (große Gele) bzw.

T = 3,5 % bis 13 % (mittlere Gele) verwendet. Der Quervernetzungsgrad ist bei den Gelen jeweils C = 3 %.

Beim Gießen von BN-Gelen werden alle Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die Trenngel-Lösungen (Tabelle 4.11) werden zusammenpipettiert und in den Gradientenmischer (Abbildung 4.5) gegeben. Die Lösung mit dem höheren Gehalt an Acrylamid wird in die linke Kavität gefüllt, die andere in die rechte Kavität mit Auslass. Durch das Öffnen eines Hahns werden die Lösungen langsam vermischt und direkt mittels einer Peristaltikpumpe über eine Kanüle in die Gelgießapparatur befördert. Wie in Abbildung 4.5 zu sehen, befindet sich der Auslass der Kanüle am Boden der Apparatur (Unterschichtung der Acrylamid-Lösungen). Dadurch kommt es zur Ausbildung eines linearen Gradienten. Die weitere Polymerisation des Trenngels erfolgt dann bei RT.

Nachdem die Polymerisation beendet ist, wird das Sammelgel hinzugegeben und ein Kamm mit 10 Taschen (mittlere Gele) bzw. 15 Taschen (große Gele) eingesteckt. Die fertigen Gele werden anschließend für mindestens 12 h bei 4 °C gelagert und können am darauffolgenden Tag verwendet werden.

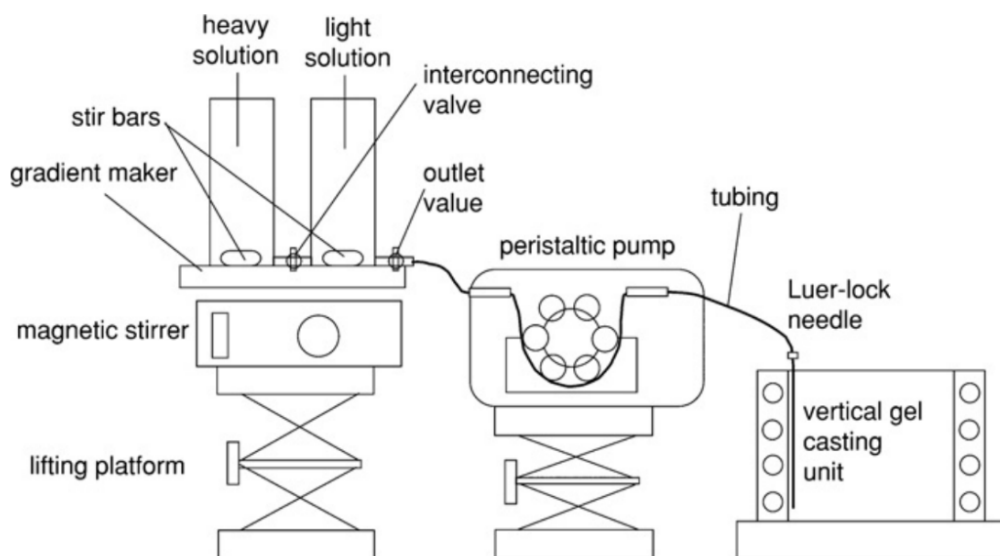


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung zum Gießen eines BN-Gradientengels, nach Krause *et al.*^[114]

Tabelle 4.11: Zusammensetzung von BN-Gelen

Bis-Tris BN-Gel		großes Gel (16 cm x 18 cm)			mittleres Gel (10 cm x 10 cm)		
		Trenngel (unten)	(oben)	Sammelgel	Trenngel (unten)	(oben)	Sammelgel
Totalacrylamid- konzentration, T	[%]	13	4	3,5	13	3	3
Vernetzungsgrad, C	[%]	3	3	3	3	3	3
Rotiphorese [®] Gel A/B 29:1	[mL]	-	-	-	2,19	-	-
Rotiphorese [®] Gel A	[mL]	13,00	4,00	0,85	0,32	0,73	0,49
Rotiphorese [®] Gel B	[mL]	3,00	3,00	0,40	-	0,34	0,23
3xBN-Gelpuffer	[mL]	-	4,94	2,50	-	2,50	1,67
3xBN-Gelpuffer + Glycerin	[mL]	4,94	-	-	2,50	-	-
dest. H ₂ O	[mL]	0,72	7,00	3,69	2,51	3,93	2,64
TEMED	[μL]	4,10	6,80	5,95	2,45	3,82	4,07
10% APS	[μL]	41,0	68,0	59,5	24,5	38,2	40,7
Gesamtvolumen	[mL]	14,82	14,82	7,5	7,5	7,5	5

Tabelle 4.12: Zusammensetzung der 3xBN-Gelpuffer für das Trenn- und Sammelgel für BN-PAGE

3xBN-Gelpuffer für BN-PAGE	3xBN-Gelpuffer + Glycerin für BN-PAGE
150 mM Bis-Tris	150 mM Bis-Tris
600 mM 6-Aminohexansäure	600 mM 6-Aminohexansäure
in dest. H ₂ O, pH 7,0 mit HCl einstellen	Glycerin 60,0 % (w/v)
	in dest. H ₂ O, pH 7,0 mit HCl einstellen

4.6.1.1 Durchführung eine BN-Gellaufs

Große Gele:

Die BN-Gelelektrophorese wird mit einer Spannung von 100 V und 15 mA pro Gel bei 4 °C gestartet. Nachdem die Coomassie-Lauffront das Trenngel erreicht hat, wird die Spannung des Netzgerätes auf 500 V erhöht. Zu Anfang werden der Kathodenpuffer B (Tabelle 4.13) und der Anodenpuffer (Tabelle 4.14) verwendet. Wenn die Lauffront die Hälfte des Trenngels erreicht hat, wird der Kathodenpuffer B durch den Kathodenpuffer B/10 ersetzt.

Mittlere Gele:

Die Elektrophorese wird ebenfalls mit einer Spannung von 100 V und 15 mA pro Gel bei 4 °C gestartet. Die Spannung des Netzgerätes wird dann auf 250 V erhöht. Nach Krause *et al.*^[114] findet kein Pufferwechsel statt. Da bei mittleren Gelen die Proteinmenge deutlich niedriger ist, ist die im Kathodenpuffer B/10 enthaltene Menge an Coomassie ausreichend für eine erfolgreiche Elektrophorese^[114].

Tabelle 4.13: Zusammensetzung des Kathodenpuffers B und B/10 für BN-PAGE

Kathodenpuffer B für BN-PAGE		Kathodenpuffer B/10 für BN-PAGE	
50 mM	Tricin	50 mM	Tricin
15 mM	Bis-Tris	15 mM	Bis-Tris
0,02 % (w/v)	Serva Brilliant Blue G-250	0,002 % (w/v)	Serva Brilliant Blue G-250
in dest. H ₂ O, pH 7,0 stellt sich ein		in dest. H ₂ O, pH 7,0 stellt sich ein	

Tabelle 4.14: Zusammensetzung des Anodenpuffers für BN-PAGE

Anodenpuffer für BN-PAGE	
50 mM	Bis-Tris
in dest. H ₂ O, pH 7,0 mit HCl einstellen	

4.6.2 Farblos-native Gelelektrophorese (CN-PAGE)

Bei der CN-PAGE handelt es sich im Vergleich zur BN-PAGE um eine mildere Methode zur gelelektrophoretischen Auftrennung von nativen Proteinen^[87]. Dem Kathodenpuffer wird kein Farbstoff zugegeben, der die Eigenladung der Proteine maskiert^[114]. Die Proteine wandern somit ausschließlich aufgrund ihrer Nettoladung. Da die Gelmatrix ein pH Wert von 7 besitzt, wandern nur saure Proteine mit einem isoelektrischen Punkt kleiner 7 zur Anode^[115]. Besonders bei der Untersuchung von Komplex V der oxidativen Phosphorylierung besitzt diese Methode den Vorteil, dass die Ausbeute an Oligomeren der ATP-Synthase (Dimeren, Trimeren und Tetrameren) deutlich erhöht ist^[64].

Im Rahmen dieser Arbeit werden große Bis-Tris CN-Gele mit einer Abmessung von 16 cm x 18 cm und einer Dicke von 1,5 mm hergestellt. Es werden Gradienten mit einer Totalacrylamidkonzentration von T = 4 % bis 13 % bzw. T = 4 % bis 9 % verwendet, der Quervernetzungsgrad ist C = 3 %. Den Gellösungen werden 0,01 % Digitonin zugesetzt, um eine Aggregation der hydrophoben Membranproteine zu verhindern^[86].

Das Gießen des CN-Gels erfolgt analog zu der in Abschnitt 4.6.1 beschriebenen Vorgehensweise. Es werden die gleichen Puffer wie bei der BN-PAGE (Tabelle 4.12) verwendet. In Tabelle 4.15 sind die Zusammensetzungen der verwendeten Gellösungen dargestellt.

Tabelle 4.15: Zusammensetzung für große CN-Gele (16 cm x 18 cm)

Bis-Tris CN-Gel		Trenngel			Sammelgel
		(unten)	(unten)	(oben)	
Totalacrylamidkonzentration, T	[%]	13	9	4	3,5
Vernetzungsgrad, C	[%]	3	3	3	3
Rotiphorese® Gel A	[mL]	6,23	4,31	1,92	0,85
Rotiphorese® Gel B	[mL]	2,89	2,00	0,89	0,40
3xBN-Gelpuffer	[mL]	-	-	4,94	2,50
3xBN-Gelpuffer + Glycerin	[mL]	4,94	4,94	-	-
dest. H ₂ O	[mL]	5,66	3,50	11,92	3,69
10 % (w/v) Digitoninlösung	[µL]	15,00	15,00	15,00	7,50
TEMED	[µL]	4,10	5,93	6,81	5,95
10 % (w/v) APS	[µL]	41,00	59,30	68,10	59,50
Gesamtvolumen	[mL]	14,82	14,82	14,82	7,5

4.6.2.1 Durchführung eines CN-Gellaufs

Da hier die Laufront keinen Farbstoff enthält, werden zu den Proben jeweils die entsprechende Menge (10 % (v/v)) einer 0,1 % (w/v) Ponceau-S-Lösung hinzugegeben. Die Elektrophoresebedingungen entsprechen denjenigen der BN-PAGE. Ebenso werden mit Ausnahme des Kathodenpuffers (Tabelle 4.16), die gleichen Puffer für den Gellauf verwendet.

Tabelle 4.16: Zusammensetzung des Kathodenpuffers

Kathodenpuffer C für CN-PAGE	
50 mM	Tricin
15 mM	Bis-Tris
in dest. H ₂ O, pH 7,0 stellt sich ein	

4.6.3 Zweidimensionale Tricin-SDS-PAGE

Nach einer nativen Auftrennung in der ersten Dimension (BN- oder CN-PAGE) können die Proteine in einer zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen (2-D SDS-PAGE) in ihre jeweiligen Untereinheiten aufgetrennt werden. Die Gelstreifen mit den nativen Proteinen und Protein(super-)komplexen werden zweimal für je 30 Minuten in 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) und 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol inkubiert. Das Mercaptoethanol ist ein Reduktionsmittel, welches die Disulfidbrücken spaltet. Das anionische Detergens SDS denaturiert die Proteine, indem es sich an die hydrophoben Bereiche des Proteins anlagert und nicht kovalente Wechselwirkungen zerstört. Es kommt zur Ausbildung von SDS-Protein-Komplexen mit einem konstanten Ladung-zu-Masse-Verhältnis (1 SDS-Molekül pro ~ 2 Aminosäuren)^[107]. Zusätzlich wird die Eigenladung der Proteine überdeckt.

Die Gelstreifen werden dann fünfmal je 1 Minute mit MilliQ-H₂O gewaschen und um 90° gedreht (Abbildung 4.6, rechts) in die Gelapparaturen eingebaut. Für das Gießen des Tricin-SDS-Gels (modifiziert nach Schägger und Jagow^[116]) werden die Gellösungen in der Reihenfolge Trenngel, Sammelgel denaturierend (denat.) und Sammelgel nativ (Tabelle 4.17) hinzugegeben. Während das native Sammelgel gegossen wird, wird ein einzelner Taschenformer für den Proteinmassenstandard neben dem Gelstreifen in die Gellösung gesteckt.

Es werden große Tricin-SDS-Gele mit einer Abmessung von 16 cm x 18 cm und mittlere Gele mit 10 cm x 10 cm jeweils mit einer Dicke von 1,5 mm hergestellt. Der Totalacrylamidgehalt beträgt $T = 13\%$ für das Trenngel und $T = 5\%$ für jedes Sammelgel.

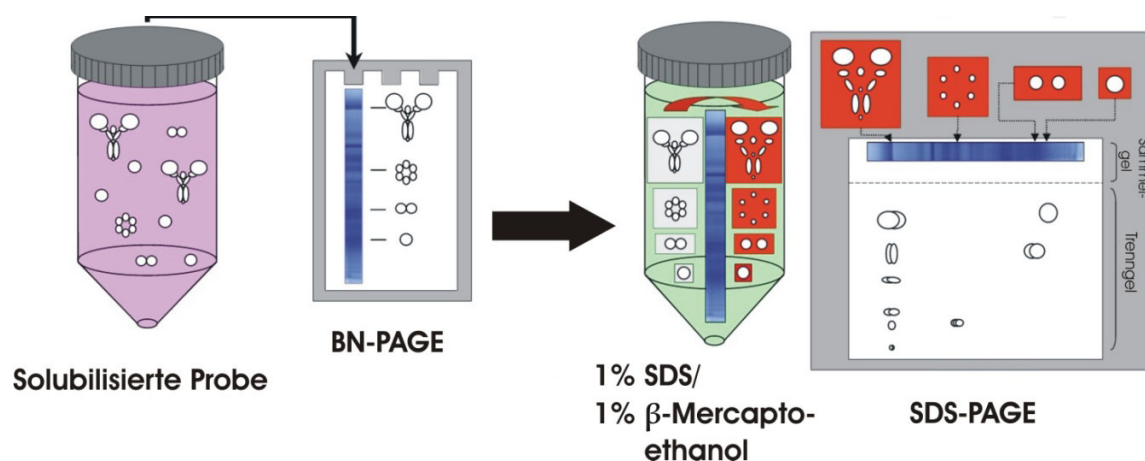


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Prinzips der 2-D SDS-PAGE, nach Eubel *et al.*^[117]

Die Elektrophorese wird mit 50 V und 80 mA pro Gel bei RT gestartet. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hat, wird die Spannung auf 150 V (bzw. über Nacht auf 85 V für große Gele bzw. 40 V für kleine Gele) erhöht.

Tabelle 4.17: Zusammensetzung von 2-D SDS-Gelen

2-D Tricin-SDS-Gel		großes Gel (16 cm x 18 cm)			mittleres Gel (10 cm x 10 cm)		
		Trenngel	Sammelgel		Trenngel	Sammelgel	
			denat.	nativ		denat.	nativ
Totalacrylamid-konzentration, T	[%]	13	5	5	13	5	5
Vernetzungsgrad, C	[%]	3	3	3	3	3	3
Rotiphorese® Gel A/B 29:1	[mL]	8,78	-	-	4,42	-	-
Rotiphorese® Gel A	[mL]	1,27	0,81	0,81	0,65	0,41	0,41
Rotiphorese® Gel B	[mL]	-	0,38	0,38	-	0,19	0,19
3×SDS-Gelpuffer	[mL]	-	1,65	-	-	0,83	-
3×SDS-Gelpuffer + Glycerin	[mL]	10,00	-	-	5,00	-	-
3×BN-Gelpuffer oben	[mL]	-	-	1,65	-	-	0,83
20 % (w/v) SDS	[μL]	-	-	50	-	-	25
dest. H ₂ O	[mL]	9,75	2,14	2,07	4,88	1,07	1,03
TEMED	[μL]	15,00	2,50	3,50	7,50	1,25	1,75
10% APS	[μL]	150,0	25,0	35,0	75,0	12,5	17,5
Gesamtvolumen	[mL]	30	5	5	15	2,5	2,5

Tabelle 4.18: Zusammensetzung des 3×SDS-Gelpuffers + Glycerin und des 3×SDS-Gelpuffers

3×SDS-Gelpuffer + Glycerin		3×SDS-Gelpuffer	
3,00 M	Tris	3,00 M	Bis-Tris
0,15 % (w/v)	SDS	0,15 % (w/v)	SDS
30,00 % (w/v)	Glycerin	in dest. H ₂ O, pH 8,5 mit HCl einstellen	
in dest. H ₂ O, pH 8,5 mit HCl einstellen			

Tabelle 4.19: Zusammensetzung des Anoden- und Kathodenpuffers

Kathodenpuffer		Anodenpuffer	
100 mM	Tricin	100 mM	Tris
100 mM	Tris	in dest. H ₂ O, pH 8,9 mit HCl einstellen	
0,05 % (w/v)	SDS		
in dest. H ₂ O, pH 8,25 stellt sich ein			

4.6.4 Proteinmassenstandards

Für die Zuordnung der Proteinbanden werden Proteinstandards bekannter molekularer Masse verwendet. Bei der nativen Elektrophorese (BN- und CN-PAGE) wird der High Molecular Weight Marker (HMW) eingesetzt. Für SDS-Gele wird der Low Molecular Weight Marker verwendet. Da es sich bei den hier eingesetzten Standards um wasserlösliche Proteine handelt, sind diese nur bedingt für die Zuordnung von Membranproteinen geeignet. Daher wird zusätzlich ein Solubilisat von Rinderherzmitochondrien (BHM, Digitonin/Proteinverhältnis 3 g/g) auf das PA-Gel gegeben. Die apparenten Molmassen der darin enthaltenen Protein(super-)komplexe wurden bereits von Schägger und Pfeiffer^[63] veröffentlicht.

Tabelle 4.20: Zusammensetzung des High Molecular Weight Marker, GE Healthcare^[118]

Molekularmasse [kDa]	Protein
669,0	Thyroglobulin, Schwein
440,0	Ferritin, Pferd
232,0	Katalase, Rind
140,0	Lactat Dehydrogenase, Rind
66,0	Albumin, Rind

Tabelle 4.21: Zusammensetzung des Low Molecular Weight Marker, GE Healthcare^[119]

Molekularmasse [kDa]	Protein
97,0	Phosphorylase b
66,0	Albumin
45,0	Ovalbumin
30,0	Carboanhydrase
20,1	Trypsin-Inhibitor
14,4	α -Lactalbumin

4.7 Färbemethoden

4.7.1 Coomassie-Färbung

Die Färbung von Proteinen in Gel mit Coomassie Brilliant Blau beruht auf dem Protokoll von Görg *et al.*^[120] und wird nach einer Variante von Rexroth *et al.*^[83] durchgeführt. Der Färbelösung (Tabelle 4.22) werden beide Varianten des Triphenylmethylenfarbstoffes Coomassie Brilliant Blue (R und G), die sich strukturell nur durch 2 Methylgruppen unterscheiden, hinzugegeben. Der Farbstoff Coomassie R-250 besitzt eine vergleichsweise niedrigere Nachweisgrenze von 30 - 100 ng Protein pro Bande bzw. Spot^[121], während bei G-250 die Hintergrundfärbung des PA-Gels reduziert wird. Zur Fixierung der Proteine in der Gelmatrix sind ebenfalls Essigsäure und Methanol in der Färbelösung enthalten. Durch die Zugabe von Kupfersulfat wird zusätzlich die Sensitivität erhöht^[122]. Diese Färbemethode ist reversibel und kann zum Quantifizieren von Proteinen verwendet werden.

Nach der Elektrophorese wird das Gel in eine Schale mit Färbelösung gelegt und für 1 Stunde bei RT unter leichtem Schütteln gefärbt. Danach wird solange mit Entfärbelösung geschwenkt bis der Hintergrund frei von Coomassie ist. Anschließend wird das Gel in dest. H₂O für 30 Minuten geschüttelt.

Tabelle 4.22: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung und der Entfärbelösung

Coomassie-Färbelösung		Entfärbelösung	
0,50 % (w/v)	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,50 % (w/v)	CuSO ₄ · 5 H ₂ O
10,00 % (v/v)	Essigsäure	10,00 % (v/v)	Essigsäure
45,00 % (v/v)	Methanol	25,00 % (v/v)	Ethanol
0,15 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250		
0,05 % (w/v)	Serva Brilliant Blue G-250		

4.7.2 Silber-Färbung

Die Silberfärbung nach Blum *et al.*^[123] und Rabilloud *et al.*^[124] ist im Vergleich zur Coomassie-Färbung eine deutlich sensitivere Methode, die Nachweisgrenze liegt in einem Bereich von 1 ng pro Proteinbande bzw. -Spot^[125]. Da diese Färbung allerdings nur einen sehr kleinen dynamischen Bereich besitzt, ist sie nicht zum Quantifizieren von Proteinen geeignet. Besonders bei den Untereinheiten α und β der ATP-Synthase (die in gleichem Verhältnis vorliegen,) ist sehr gut zu erkennen, dass es große Unterschiede in der Färbeintensität gibt^[126]. Das Protokoll für die Silberfärbung ist in Tabelle 4.23 aufgelistet. Zuerst wird das Gel je für 1 Stunde in Fixierer I bzw. II inkubiert. Dann erfolgt eine Sensibilisierung der Proteine mit Natriumthiosulfat. Dies hat zwei Vorteile, zum einen wird die Bindungsaffinität der Silberionen an Proteine durch Bildung von Silbersulfiden erhöht, zum anderen wird die Hintergrundfärbung des Gels deutlich reduziert^[123].

Während der Imprägnierung des Gels kommt es zur Bildung von Protein-Silber-Komplexen. Diese werden im nächsten Schritt unter alkalischen Bedingungen durch Formaldehyd zu

elementarem Silber reduziert (Abbildung 4.7). Um eine zu starke Färbung des Hintergrundes zu vermeiden wird die Reaktion durch Zugabe einer sauren Lösung (Stopp-Lösung) beendet.

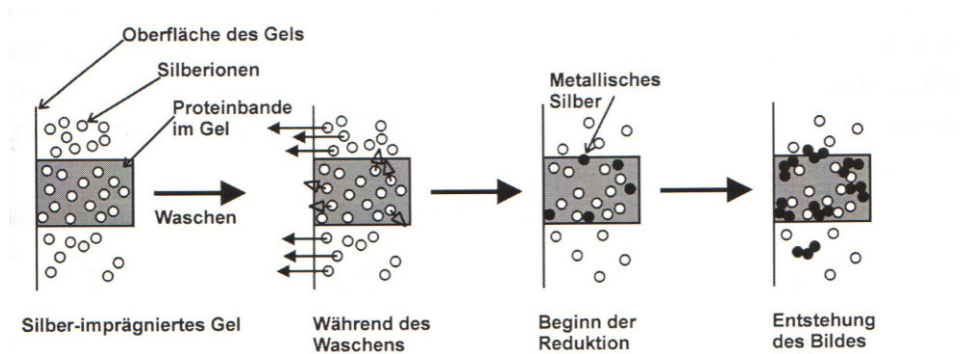


Abbildung 4.7: Entstehung des Bildes während der Silberfärbung (Schema)^[124], modifiziert von Seelert^[126]

Tabelle 4.23: Färbeprotokoll für die Silberfärbung, ausreichend für 1 großes Gel oder 3 mittlere Gele.

Schritt	Konzentration	Komponente
Fixierschritt I (60 min)	50 % (v/v)	Methanol
	12 % (v/v)	Essigsäure
Fixierschritt II (60 min)	50 % (v/v)	Ethanol
Sensitivierer (1 x 1 min)	0,81 mM	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O
Waschschrift (2 x 1 min) mit dest. H ₂ O		
Silber (1 x 20 min)	11,77 mM	AgNO ₃
	0,075 % (v/v)	Formaldehyd (37 %ig)
Waschschrift (1 x 1 min) mit dest. H ₂ O		
Färbung	57 mM	Na ₂ CO ₃
	0,20 mM	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O
	0,05 % (v/v)	Formaldehyd (37 %ig)
Waschschrift mit dest. H ₂ O		
Stopplösung (1 x 10 min)	10 % (v/v)	Essigsäure
Lagerlösung	1 % (v/v)	Essigsäure

4.7.3 Sypro[®] Ruby-Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff Sypro[®] Ruby ist ein Metall-Chelat-Komplex, bei dem ein Rutheniumion über 3 Phenanthroline koordiniert ist (Abbildung 4.8). Die Bindung an Proteine erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen der Sulfonat-Gruppen an basische Aminosäurereste und über Koordination an das Polypeptidrückgrat^[127]. Die Nachweisgrenze liegt laut Hersteller in einem Bereich von 0,25 - 1 ng pro Protein^[128]. Zusätzlich besitzt es einen großen dynamischen Bereich von 3 bis 4 Größenordnungen und ist daher zum Quantifizieren von Proteinen geeignet^[129, 130].

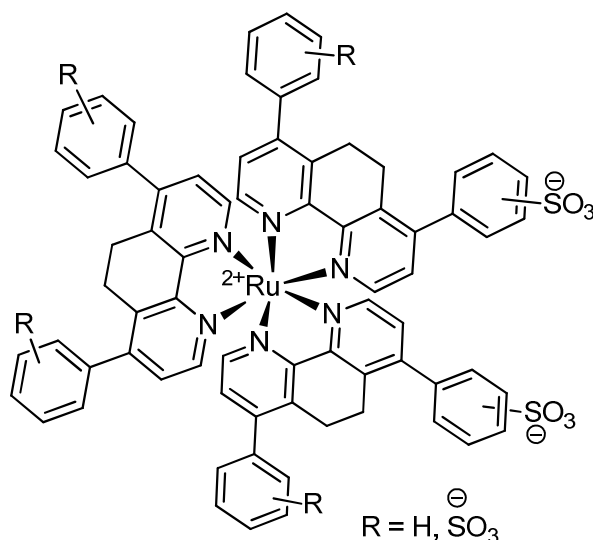


Abbildung 4.8: Strukturformel des Sypro® Ruby-Farbstoffes, nach Volkova *et al.*^[131]

Die Durchführung der Sypro® Ruby-Färbung erfolgt nach der Bedienungsanleitung des Herstellers Molecular Probes^[128]. Das zu färbende Gel wird für 1 Stunde unter leichtem Schütteln in einer Fixierlösung (Tabelle 4.24) bei RT inkubiert. Da der Fluoreszenzfarbstoff lichtempfindlich ist, erfolgt die Inkubation in Sypro® Ruby-Lösung unter Lichtausschluss für 3 Stunden. Für große Gele wird ein Volumen von 120 mL, für mittlere Gele 70 mL verwendet. Danach wird das Gel zuerst 10 Minuten in der Fixierlösung und dann 10 Minuten in dest. H₂O geschüttelt. Die Fluoreszenzdetektion wird mit Hilfe eines CCD-Kamerasystems der Firma Fujifilm, LAS-3000, bei einer Anregungswellenlänge $\lambda = 460$ nm, einem Emissions-Filter mit $\lambda = 605$ nm und einer Blendenzahl $F = 0,85$ durchgeführt.

Tabelle 4.24: Zusammensetzung der Sypro® Ruby-Fixierlösung

Sypro® Ruby-Fixierlösung	
10 % (v/v)	Methanol
7 % (v/v)	Essigsäure

4.8 In-Gel Aktivitätstest

Nach einer nativen Elektrophorese (BN- oder CN-PAGE) können die Protein und Protein-(super-)komplexe der mitochondrialen Atmungskette mit Hilfe von In-Gel Aktivitätstests nachgewiesen werden. Diese beruhen auf Redoxreaktionen zwischen einem Substrat und dem enzymatisch aktiven Protein, wodurch ein farbiges Präzipitat auf der entsprechenden Proteinbande im Gel gebildet wird. Bei einem qualitativen Aktivitätstest können dadurch Aussagen über die Zusammensetzung von Proteinbanden (im Hinblick auf die untersuchten OxPhos-Komplexe) und deren Zuordnung im Gel getroffen werden. Darüber hinaus kann bei einem quantitativen Test die spezifische Aktivität des entsprechenden Proteins ermittelt werden. Hierfür werden Graustufenbilder der Präzipitatbildung zu festgelegten Zeitpunkten aufgenommen und anschließend mit der Software Delta 2D quantitativ ausgewertet.

4.8.1 In-Gel Aktivitätstest für Komplex I

Bei dem Aktivitätstest für Komplex I wird das Nitrotetrazoliumblauschlorid (NBT) durch die NADH-Dehydrogenase, eine Untereinheit der NADH-Q-Oxidoreduktase (Komplex I), zu violetter Formazan (Abbildung 4.9) reduziert.

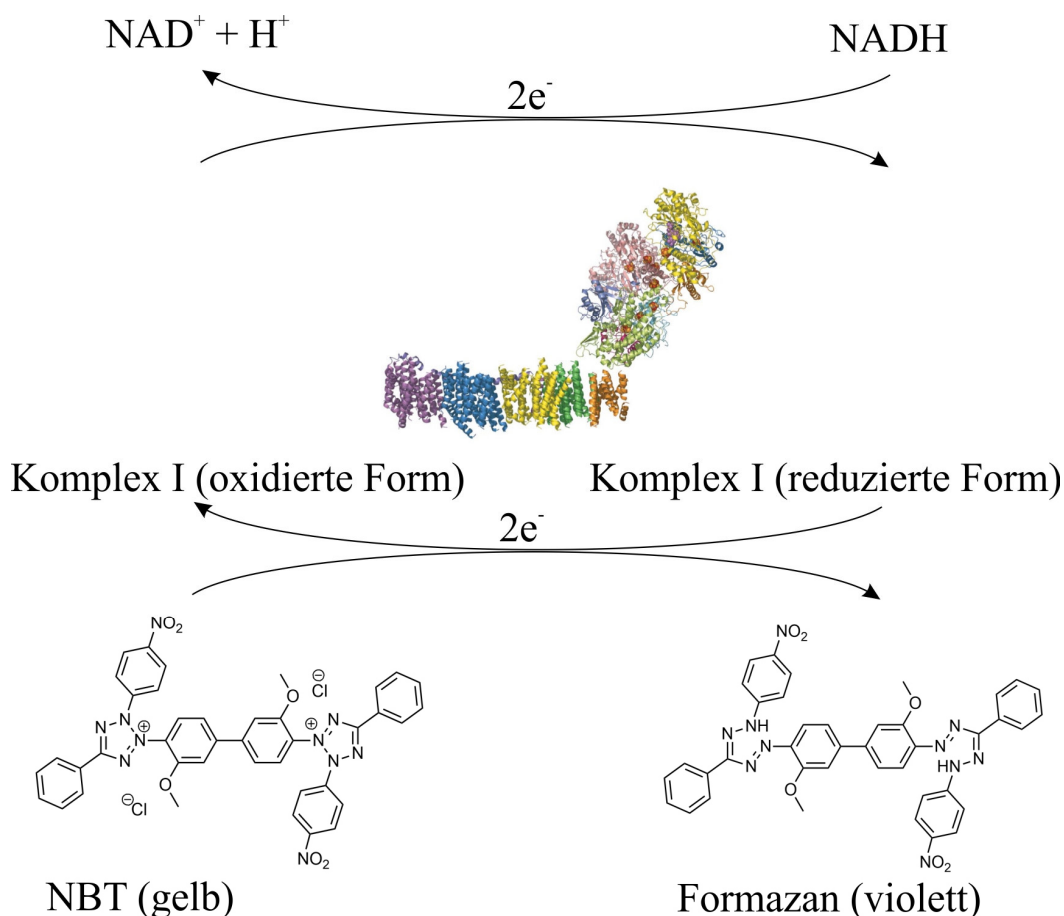


Abbildung 4.9: Reaktion während des Aktivitätstests für Komplex I, die NADH-Dehydrogenase oxidiert NADH zu NAD⁺+H⁺, nimmt 2 Elektronen auf und reduziert Nitrotetrazoliumblauschlorid (NBT) zu dem violetten Formazan. Struktur von Komplex I nach Efremov *et al.*^[132], Reaktionsschema nach Heidrich^[133].

Der Aktivitätstest wird nach einer Variante von Heidrich^[133] und Kratochwil^[3], basierend auf dem Protokoll von Grandier-Vazeille *et al.*^[134] durchgeführt. Nach der Elektrophorese wird das Gel in eine Färbeschale mit Aktivitätstest-Lösung (Tabelle 4.25) überführt und unter leichtem Schütteln bei RT solange inkubiert bis eine Färbung der Proteinbanden erkennbar ist. Für eine quantitative Auswertung der Präzipitatsbildung wird das Gel für 90 Minuten in der Aktivitätstest-Lösung inkubiert. Während der ersten 30 Minuten wird ein Graustufenbild des Gels alle 3 Minuten aufgenommen, danach alle 5 Minuten und nach einer 1 Stunde alle 10 Minuten. Dann wird das Gel für 30 Minuten in der Stopplösung (Tabelle 4.25) geschwenkt und anschließend für 20 Minuten in dest. H₂O gewaschen. Für das Scannen der Gelbilder wird das Bio-Imaging-System ViewPix 900 (Biostep/Epson) verwendet.

Tabelle 4.25: Zusammensetzung der Lösungen für den Aktivitätstest von Komplex I

Aktivitätstest-Lösung für Komplex I		Stopplösung	
100 mM	Tris	50 % (v/v)	Methanol
768 mM	Glycin	10 % (v/v)	Essigsäure
0,49 mM	NBT		
in dest. H ₂ O, pH 7,4 mit HCl einstellen			
0,1 mM	β-NADH		

4.8.2 In-Gel Aktivitätstest für Komplex IV

Bei dem diesem Aktivitätstest wird Cytochrom *c* von der Q-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (Komplex IV) oxidiert. Anschließend werden Elektronen von 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) auf Cytochrom *c* übertragen. Dabei entsteht eine oxidierte polymerisierte Form von DAB, die sich als braunes Präzipitat in den entsprechenden Gelbanden absetzt (Abbildung 4.10).

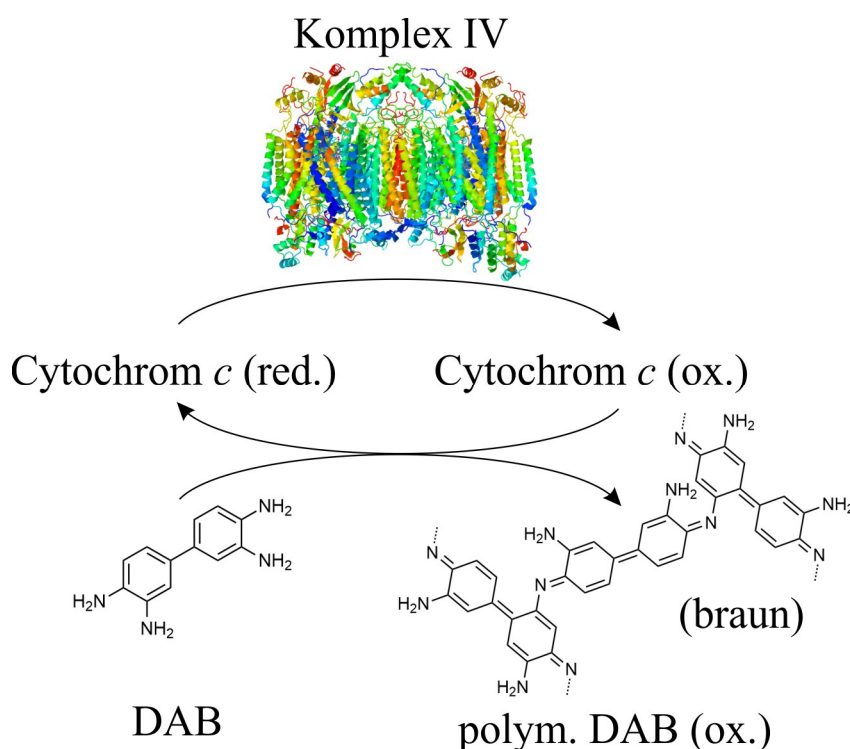


Abbildung 4.10: Reaktion während des Aktivitätstests für Komplex IV, nach der Oxidation von Cytochrom *c* durch Komplex IV wird Daminobenzidin (DAB) zum entsprechenden braunen Polymer oxidiert. Struktur von Komplex IV von RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org), PDB ID 2OCC nach Tsukihara *et al.*^[135], Reaktionsschema nach Heidrich^[133] und Seligmann *et al.*^[136]

Der Aktivitätstest wird nach einer Variante von Heidrich^[133] und Kratochwil^[3], basierend auf dem Protokoll von Wittig *et al.*^[137] durchgeführt. Nach der Elektrophorese wird das Gel in eine Färbeschale mit Aktivitätstest-Lösung (Tabelle 4.26) überführt und unter leichtem

Schütteln bei RT solange inkubiert, bis eine Färbung der Proteinbanden erkennbar ist. Für eine quantitative Auswertung der Präzipitatsbildung wird das Gel für 120 Minuten in der Aktivitätstest-Lösung inkubiert. Während der ersten 60 Minuten wird ein Graustufenbild des Gels alle 5 Minuten aufgenommen und danach alle 10 Minuten. Dann wird das Gel für 30 Minuten in der Stopplösung (Tabelle 4.26) geschwenkt und anschließend für 20 Minuten in dest. H₂O gewaschen. Für das Scannen der Gelbilder wird das Bio-Imaging-System ViewPix 900 (Biostep/Epson) verwendet.

Tabelle 4.26: Zusammensetzung der Lösungen für den Aktivitätstest von Komplex IV

Aktivitätstest-Lösung für Komplex IV	Stopplösung
50,00 mM Na ₃ PO ₄ · 12 H ₂ O	50 % (v/v) Methanol
5,00 µM Cytochrom <i>c</i>	10 % (v/v) Essigsäure
1,58 mM DAB	
in dest. H ₂ O, pH 7,2 mit HCl einstellen	

4.8.3 In-Gel Aktivitätstest für Komplex V

Dieser Test beruht auf der Hydrolyse-Aktivität der ATP-Synthase (Komplex V). Hierbei kommt es zu einer Dephosphorylierung von ATP zu ADP durch den F₁-Kopfteil von Komplex V (Abbildung 4.11). Dabei frei werdendes Phosphat reagiert mit Bleinitrat zu schwerlöslichem Bleiphosphat, das als weißes Präzipitat auf den Proteinbanden ausfällt.

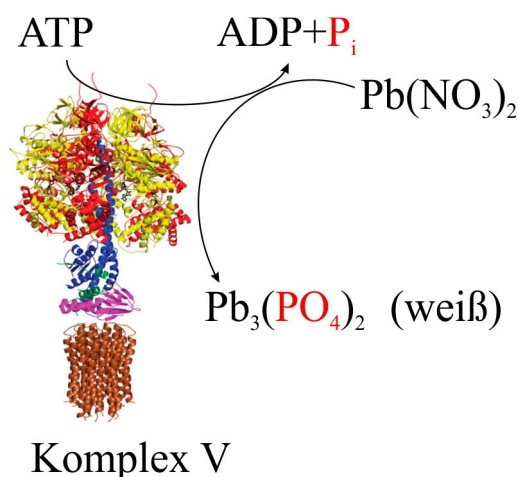


Abbildung 4.11: Reaktion während des Aktivitätstests für Komplex V, der Kopfteil der ATP-Synthase hydrolysiert ATP. Dabei frei werdende Phosphat-Ionen (PO₄³⁻) reagieren mit Bleinitrat zu dem schwerlöslichen weißen Bleiphosphat. Struktur von Komplex V nach Watt *et al.*^[28], Reaktionsschema nach Heidrich^[133]

Für diesen Aktivitätstest wird ein modifiziertes Protokoll nach Suhai *et al.*^[138] verwendet. Bei der verwendeten Aktivitätstest-Lösung ist die Konzentrationen von ATP und Bleinitrat halbiert. Das Scannen des Gels erfolgt mit Hilfe des CCD-Kamerasystems der Firma Fujifilm, LAS-3000, bei eingeschaltetem weißen Licht ohne Emissions-Filter und einer Blendenzahl

$F = 2,8$. Für quantitative Untersuchungen wird das Gel für 6 Stunden unter leichtem Schütteln bei RT in der Aktivitätstest-Lösung (Tabelle 4.27) inkubiert. In der ersten Stunde wird ein Graustufenbild des Gels alle 10 Minuten aufgenommen, während der 2. Stunde alle 15 Minuten, während der 3. Stunde alle 30 Minuten und danach alle 60 Minuten. Um zu überprüfen, ob die enzymatische Reaktion ihren Sättigungsbereich erreicht hat, wird das Gel für weitere 14 Stunden in der Aktivitätstest-Lösung inkubiert. Dann wird die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung (Tabelle 4.27) beendet und anschließend für 1 Stunde in dest. H_2O gewaschen.

Tabelle 4.27: Zusammensetzung der Puffer für den Aktivitätstest von Komplex V

Aktivitätstest-Lösung für Komplex V		Stopplösung für Komplex V	
35 mM	Tris	50 % (v/v)	Methanol
270 mM	Glycin		
14 mM	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		
0,10 % (w/v)	$Pb(NO_3)_2$		
in dest. H_2O , pH 7,8 mit HNO_3 einstellen			
4 mM	ATP		

4.9 Western Blot

Bei dem Western Blot handelt es sich um ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Nach der Gelelektrophorese werden die Proteine auf eine Membran transferiert und das gesuchte Protein wird mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Das Verfahren zum Blotten von 2-D BN/SDS-Gelen wurde von Dipl. Biochem. Victoria Decker^[139] und ihren Studenten Stefanie Eckes und Elisabeth Krämer etabliert.

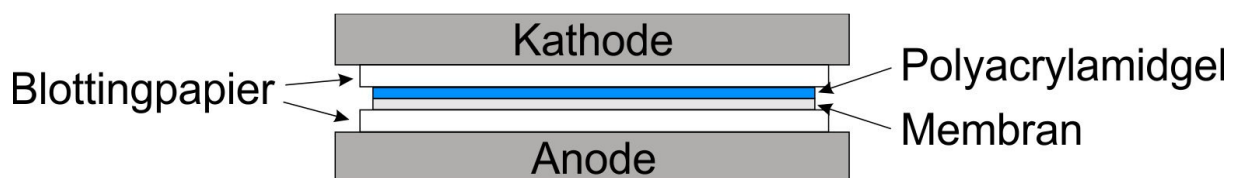


Abbildung 4.12: schematischer Aufbau eines Blots nach dem Semi-Dry-Verfahren

Während der Gelelektrophorese wird die Membran auf die Größe des zu blottenden Gel zugeschnitten. Für native Gele wird eine PVDF-Membran, für denaturierende Gele eine Nitrocellulose (NC)-Membran verwendet. Das Whatmann®-Blotting Papier wird so angepasst, dass es etwa 0,3 mm größer in Höhe und Breite des Gels ist. Die Membran wird für 10 Minuten in Methanol (PVDF) bzw. Towbin-Puffer (NC) inkubiert und die Blottingpapiere werden in Towbin-Puffer (Tabelle 4.28) gelegt. Nach der PAGE werden Membran, Gel und Blottingpapiere, wie in Abbildung 4.12 dargestellt, zusammengebaut. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befinden. Das Gel wird nun bei 20 V und 400 mA für 1 Stunde geblottet.

Nach Beendigung des Blottens werden die Blottingpapiere und das Gel vorsichtig entfernt. Die Membran wird in Roti[®]-Block (10x Konzentrat, 9 Teile dest. H₂O mit einem Teil Konzentrat) für 1 Stunde bei RT (oder über Nacht bei 4 °C) unter leichtem Schütteln inkubiert. Dies dient der Sättigung unspezifischer Bindestellen der Membran. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem Primärantikörper für 2 Stunden bei RT (oder über Nacht bei 4 °C). Danach wird die Membran dreimal für je 5 Minuten mit PBS-Tween-Puffer (Tabelle 4.28) gewaschen. Nach einer weiteren Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde bei RT, wird erneut dreimal mit PBS-Tween-Puffer gewaschen.

Tabelle 4.28: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für Western Blots

PBS-Tween-Puffer		Towbin-Puffer	
2,7 mM	KCl	120 mM	Glycin
2,0 mM	KH ₂ PO ₄	25 mM	Tris
137,0 mM	NaCl	20,0 % (v/v)	Methanol
10,0 mM	Na ₂ HPO ₄		
0,1 % (w/v)	Tween [®] 20		

Die Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgt mittels der Chemilumineszenz-Reaktion von Luminol. Die Meerrettich-Peroxidase (HRP), welche an den Sekundärantikörper gebunden ist, katalysiert die Umsetzung von Luminol unter Zugabe von Wasserstoffperoxid zum entsprechenden Oxidationsprodukt. Hierbei kommt es zur Ausbildung eines elektronisch angeregten Übergangszustandes, der unter Abgabe eines Photons wieder in den Grundzustand übergeht. Dieses Signal kann mit Hilfe der CCD-Kamera LAS-3000 detektiert werden.

Für die Chemilumineszenz-Reaktion wird das Protokoll nach Haan und Behrmann^[140] durchgeführt. Es werden 5 mL der Chemilumineszenz-Lösung (Tabelle 4.29) auf die Membran gegeben und danach ein Bild mit der CCD-Kamera ohne Lichtquelle, ohne Filter und einer Blendenzahl F = 0,85 aufgenommen.

Alle Western Blots wurden von der Masterstudentin Olga Ankudin unter meiner Anleitung durchgeführt. Ein Teil der Blots sind im Rahmen ihrer Masterarbeit^[89] veröffentlicht.

Tabelle 4.29: Zusammensetzung der Chemilumineszenz-Lösung

Chemilumineszenz-Lösung	
100 mM	Tris/HCl pH 8,8
1,25 mM	Luminol
2,00 mM	4-IPBA in DMSO
5,30 mM	H ₂ O ₂

4.9.1 Regeneration der Membran

Eine Western Blot-Membran kann zum Nachweis von verschiedenen Antigenen verwendet werden. Hierfür müssen allerdings nach durchgeführter Detektion die Primär- und die Sekundärantikörper entfernt werden.

Die Membran wird zweimal für je 10 Minuten in Stripping-Puffer (Tabelle 4.30) bei RT inkubiert. Anschließend wird zweimal für 10 Minuten mit PBS-Puffer und danach zweimal für 5 Minuten mit dem PBS-Tween-Puffer gewaschen. Nach Inkubation in 1xRoti[®]-Block für 1 Stunde kann erneut das Protokoll aus Abschnitt 4.9 durchgeführt werden.

Tabelle 4.30: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für das Regenerieren der Membran

PBS-Puffer		Stripping-Puffer	
2,7 mM	KCl	200 mM	Glycin
2,0 mM	KH ₂ PO ₄	0,1 % (w/v)	SDS
137,0 mM	NaCl	1,0 % (v/v)	Tween [®] 20
10,0 mM	Na ₂ HPO ₄	in dest. H ₂ O, pH 2,2 mit HCl einstellen	

4.9.2 Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper richten sich spezifisch gegen die Untereinheiten der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung (I-V) und sind in den Tabellen 4.31 und 4.32 aufgeführt. Alle Primär- und Sekundärantikörper werden in Protein-free T20 (PBS) Blocking Buffer von Pierce angesetzt.

Tabelle 4.31: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Wirt	Konzentration [µg mL ⁻¹]	getestete Organismen
α-NDUS1 (Komplex I)	Kaninchen	1,0	Mensch, Maus, Ratte
α-SDHA (Komplex II)	Maus	0,1	Mensch, Maus, Ratte, Rind, Hund
α-QCR2 (Komplex III)	Maus	1,0	Mensch, Maus, Ratte, Rind
α-COX1 (Komplex IV)	Maus	0,5	Mensch, Maus, Ratte, Rind
α-ATPA (Komplex V)	Maus	1,0	Mensch, Maus, Ratte, Rind

Tabelle 4.32: Verwendete Sekundärantikörper

Konjugat	Wirt	Konzentration [µg mL ⁻¹]	Antigen
IgG-HRP	Esel	0,4	α-Maus
IgG-HRP	Esel	0,4	α-Kaninchen

4.9.3 Proteinmassenstandard für 2-D Western Blots

Bei den Western Blots von 2-D BN/SDS-Gelen wird als Proteinmassenstandard der MagicMark™ XP Western Protein Standard von Invitrogen verwendet. Dieser besteht aus 9 rekombinant hergestellten Proteinen, die jeweils eine IgG-Bindungsstelle besitzen und einen Massenbereich von 20 - 220 kDa abdecken^[141].

4.10 Peptide Mass Fingerprint

"Peptide Mass Fingerprint" ist eine Analysemethode aus dem Bereich der Massenspektrometrie für die Identifizierung von Proteinen aus 2D SDS-Gelen. Proteinspots werden aus den Gelen mit einer Hautstanze (Ø 2,0 mm) ausgeschnitten und entfärbt. Anschließend werden die Proteine mit der Protease Trypsin, die selektiv Peptidbindungen auf der C-terminalen Seite nach Arginin oder Lysin spaltet, verdaut. Die erhaltenen Peptide werden aus den Gelstücken extrahiert, auf ein Target gebracht und eine Matrix-Lösung hinzugegeben. Nach Verdunstung des Lösemittels kommt es zu einer Kokristallisation von Matrix und Peptiden. Als geeignete Matrix wird die α -Cyano-4-hydroxymizsäure^[142] (HCCA) verwendet. Die weitere Analyse der Peptide erfolgt mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI-MS).

Durch den eingesetzten Laser findet eine elektronische Anregung des π -Elektronen-systems der aromatischen Matrixmoleküle statt. Hierbei wird auch Energie auf die in der Matrix eingebetteten Peptide übertragen. Es kommt zur Ionisation und Freisetzung in die Gasphase. Nach einer Beschleunigung durch Anlegen eines elektrischen Feldes fliegen die geladenen Peptide durch eine evakuierte Kammer zum Detektor. Die dafür benötigte Zeit wird gemessen (Time of Flight, TOF). Die Geschwindigkeit mit der sich die Teilchen bewegen ist abhängig von ihrem Masse zu Ladung (m/z)-Verhältnis. Eine Software erstellt aus den erhaltenen Daten ein Spektrum mit den m/z -Verhältnissen und den entsprechenden Intensitäten. Mit Datenbanken (z.B. Mascot von Matrix Science) können die Peaks dieser spezifischen Peptide den entsprechenden Proteinen zugeordnet werden.

Für die Messung wurden Proteinspots aus großen 2D-BN/SDS-Gelen ausgeschnitten. Für jedes 2D-Gel wurden 140 μ g (vor. Solub) Mitochondrienproteine auf das BN-Gel in der ersten Dimension geladen. Nach der Elektrophorese in der zweiten Dimension wurden die Gele mit Silber gefärbt (Abschnitt 4.7.2), anschließend in Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert. Das Ausschneiden und Entfärben der Proteinspots wurde in Darmstadt durchgeführt. Die weitere Probenpräparation wurde in Düsseldorf am Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ) mit meiner Kollegin Dr. Manuela Kratochwil unter Anleitung von Dr. Stefan Lehr und Dr. Sonja Hartwig durchgeführt. Um eine Kontamination der Proben mit Keratin zu verhindern wurden bei allen Arbeitsschritten Latex-Handschuhe und Ärmelschoner getragen.

Die entsprechenden Protokolle für die Probenpräparation wurden bereits in der Dissertation von Manuela Kratochwil^[3] ausführlich beschrieben und können dort nachgelesen werden.

4.10.1 Messung

Wie oben beschrieben werden alle Messungen im DDZ in Düsseldorf durchgeführt. Es wird ein MALDI-TOF/TOF MS Ultraflex I von Bruker verwendet. Die Parameter der Messungen sind in Tabelle 4.33 aufgeführt.

Tabelle 4.33: Messparameter für MALDI-TOF/TOF

Einstellungen für Messungen mit MALDI-TOF/TOF Ultraflex I	
Instrumentenmodus	Reflektor, positive
Schuss/ Spektrum	summiert 600 in 100 Schussintervallen (fuzzy logic)
Massenbereich [DA]	680-4000, Peakbereich für die Auswertung (900 to 2300)
Unterer Massenbereich [Da]	680
Kalibration, Matrix	PAC II, HCCA
Laserfrequenz	50 Hz
Laserintensität	automatisch kontrolliert durch fuzzy logic control Modul

Als Target wird das HCCA Prespotted AnchorChip (PAC) II-Target von Bruker Daltonik verwendet. Es besitzt einen externen Standard (Tabelle 4.34). Als interner Standard werden die charakteristischen Peptidpeaks von Trypsin verwendet. Die Kalibration der erhaltenen Spektren erfolgt automatisch durch die Software Compass 1.3 von Bruker.

Tabelle 4.34: Massen des externen Kalibrationsstandards auf dem PAC II-Target

Externer Kalibrationsstandard^[143], PAC II-Target	
Monoisotopische Masse [Da]	Protein
757,399	Kalibrant 1
1046,542	Kalibrant 2
1296,685	Kalibrant 3
1672,917	Kalibrant 4
1758,933	Kalibrant 5
2016,989	Kalibrant 6
2406,289	Kalibrant 7
2981,586	Kalibrant 8
3574,877	Kalibrant 9

Entsprechende Spektren werden an die Software Proteinscape 3.1 von Bruker transferiert und den vor dem Starten der Messung eingetragenen Proteinspots auf dem 2D-Gel zugeordnet. Direkt im Anschluss wird eine Suche nach bekannten Peaklisten in der Mascot Datenbank von Matrix Science durchgeführt. Die verwendeten Parameter der Datenbanksuche sind in Tabelle 4.35 aufgelistet.

Tabelle 4.35: Parameter für die Identifizierung von Peptiden mit MALDI-TOF/TOF MS Ultraflex I von Bruker

Einstellung für die Identifizierung von Peptiden		
Datenbank:	SwissProt	
Enzym:	Trypsin, eine verpasste Spaltung (missed cleavage)	
Taxonomie:	Mus musculus	Mäuseherzgewebe
	Mammalia (mammals)	Schweineherzgewebe
		Wildschweinherzgewebe
		Rehherzgewebe
		Rehnierengewebe
	Plants	Mitochondrien aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Feste Modifikationen:	keine ausgewählt	
Variable Modifikationen:	Oxidation (M)	
	Carbamidomethyl (C)	
Peptidtoleranz:	± 100 ppm	
Signifikanzschwellenwert:	$p < 0,05$	
Massenwert:	MH^+ , monoisotopische	

4.11 Quantifizierung von Proteinen

4.11.1 Quantifizierung von Proteinspots in 2D-Gelen

Die Quantifizierung von Sypro[®]Ruby gefärbten 2D-Gelen erfolgt mit der Software Delta2D von Decodon^[144]. Die Auswertung basiert auf den Arbeiten von Frenzel^[145], Thilmany^[95] und Kratochwil^[3]. Graustufenbilder der Gele werden mittels des CCD-Kamerasystem LAS 3000 (beschrieben in Abschnitt 4.7.3) aufgenommen und in das Programm importiert. Danach wird das Warping der Gelbilder mit der Einstellung "Group Warping Strategy" durchgeführt. Hierbei werden jeweils zwischen den identischen Proteinspots von 2 Gelen Match Vektoren generiert. Am Gelrand kommt es meist zur Bildung von Artefakten, welche die Software fälschlicherweise als Proteine erkennt. Entsprechende Vektoren werden manuell entfernt. Anschließend legt die Software alle "gewarpeten" Bilder übereinander und erzeugt daraus ein Fusionsbild. In diesem Bild werden die entsprechenden Proteinspots markiert, beschriftet und dann auf die Graustufenbilder der Gele transferiert. Um die Graustufenverteilung in ausgewählten Spots näher zu untersuchen, können diese in dem 3D-Spot Tool von Delta 2D räumlich dargestellt werden. In Abbildung 4.13 ist ein Graustufenbild von einem Sypro[®]Ruby-gefärbten 2D-BN/SDS-Gel von BHM (A) dargestellt. Des Weiteren wurde die Untereinheit COX1 von Komplex IV (orange) auf dem Gelbild ausgewählt und mit dem Spot Tool 3-dimensional dargestellt (B).

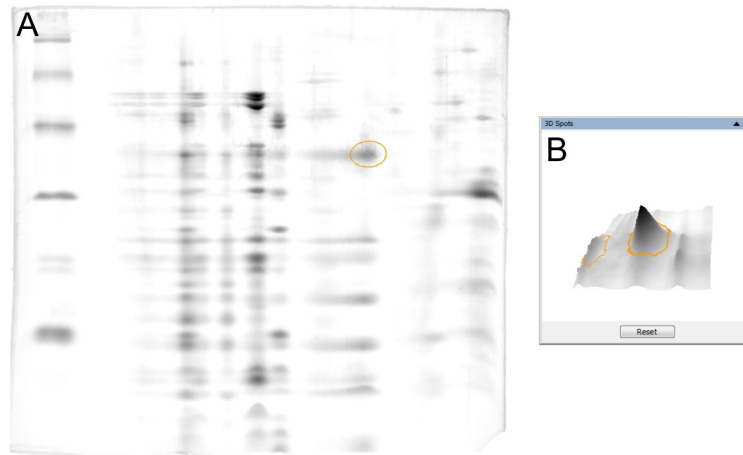


Abbildung 4.13: Beispiel für die 3-dimensionale Darstellung eines Proteinspots. A: Graustufenbild eines großen 2D-BN/SDS-Gels von BHM (140 µg, vor Solub., 3 g/g). B: Darstellung der Untereinheit COX1 (orange) im 3D-Spot Tool von Delta 2D

Für die Quantifizierung berechnet das Programm aus der Gesamtheit der Graustufenpixel für jeden ausgewählten Spot das absolute Graustufenwertvolumen V [Grey Units, (GU)]. Eine wichtige Voraussetzung für diese Berechnung ist, dass alle Graustufenwerte innerhalb des linearen Bereichs liegen und es während der Aufnahme des Graustufenbildes mit der CCD-Kamera zu keiner Überbelichtung eines Proteinspots gekommen ist.

Da die Gelbilder in der Regel unterschiedliche Färbintensitäten aufweisen, sind die Werte von verschiedenen Gelen nun bedingt miteinander vergleichbar. Daher wird an dieser Stelle mit dem relativen Graustufenwertvolumen $V\%$ [rel. GU] gearbeitet. Hierbei handelt es sich um das Verhältnis des absoluten Graustufenwertvolumen V des entsprechenden Spots und der Gesamtheit der Graustufenwerte aller markierten Spots. Wenn $V\%$ auf die gesamte Proteinmenge bezogen werden soll, müssen alle Proteinspots markiert werden. Die Spots, die nicht näher untersucht werden sollen, werden mit der "Hide"-Funktion versteckt, das Graustufenwertvolumen wird aber dennoch für die Berechnung der gesamten Proteinmenge ($\sum_{i=0}^n V_i$) berücksichtigt.

4.11.2 Quantifizierung von In-Gel Aktivitätstests (BN-Gele)

Die Auswertung der In-Gel Aktivitätstests für BN-Gele erfolgt nach einer Vorschrift nach Thilmany^[95]. Die Bildung des Präzipitats ist abhängig von der Zeit, der Proteinmenge und der Aktivität des entsprechenden Proteins. Zu dem Zeitpunkt t_0 (direkt nach der Elektrophorese) wurde noch kein Präzipitat gebildet und auf dem Gel sind nur die mit Coomassie Brilliant Blue gefärbten Proteinbanden (siehe Abschnitt 4.6.1) zu erkennen. Da die Bindung von Coomassie proportional zu der Proteinmenge ist, kann der Graustufenwert V zum Zeitpunkt t_0 als Näherung für die Proteinmenge der jeweiligen Bande angenommen werden. Die Bildung von Präzipitat zum Zeitpunkt t_x ergibt sich aus der Differenz der Graustufenwerte V zum Zeitpunkt t_x und t_0 . Da die spezifische Aktivität als Umsatzgeschwindigkeit eines Substrats bezogen auf die eingesetzte Enzymmenge definiert ist, ergibt sich hieraus folgende Gleichung für die relative spezifische Aktivität:

$$a_{spez} = \frac{t_x - t_0}{t_0}$$

Bei der spezifischen Aktivität von Superkomplexen muss noch ein zusätzlicher Faktor F_1 eingesetzt werden. Da für die Präzipitatbildung jeweils nur die aktive Untereinheit eines individuellen Komplexes verantwortlich ist, darf auch nur dieser Anteil des Superkomplexes in die Berechnung der Aktivität einfließen:

$$F_1 = \frac{m_{\text{individueller Komplex}}}{m_{\text{Superkomplex}}}$$

Dementsprechend ergibt sich folgende Formel für die relative spezifische Aktivität von Superkomplexen:

$$a_{spez} = \frac{t_x - t_0}{t_0 \cdot F_1}$$

Bei den Aktivitätstests für Komplex IV gibt es darüber hinaus noch den Fall, dass mehrere Kopien des aktiven individuellen Komplexes in den Superkomplexen enthalten sind. Hier wird der Faktor F_2 , der die Anzahl der individuellen Komplexe repräsentiert, verwendet:

$$a_{spez} = \frac{t_x - t_0}{t_0 \cdot F_1 \cdot F_2}$$

Die mit diesen Formeln ermittelten Graustufenwerte werden grafisch gegen die Zeit aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Die Steigung dieser Geraden stellt die relative spezifische Aktivität der entsprechenden Proteinbande in der Einheit GU pro Minute dar. In der Regel werden für jeden Aktivitätstest nur die Daten der ersten 90 Minuten für die Auswertung verwendet.

4.11.3 Quantifizierung von In-Gel Aktivitätstests (CN-Gele)

Im Gegensatz zu BN-Gelen werden bei CN-Gelen keine farbigen Ladungsträger dem Kathodenpuffer zugesetzt. Daher kann für die Proteinmenge keine Näherung nach der in Abschnitt 4.11.2 beschriebenen Weise durchgeführt werden. Ein weiteres Problem stellt das unterschiedliche Laufverhalten der Proteine während der CN-Page dar. Zum einen sind die Proteinbanden deutlich diffuser, zum anderen überlagern sich die Banden der Homooligomere der ATP-Synthase und der Superkomplexe. Daher werden jeweils 3 technische Replikate der CN-Spur in der ersten Dimension für eine 2D-PAGE verwendet. Die Gele werden mit Sypro[®]Ruby gefärbt und wie in Abschnitt 4.11.1 beschrieben mit Delta 2D ausgewertet. Für den Hydrolyse-Aktivitätstest von Komplex V sind hauptsächlich die Untereinheiten α und β des F_1 -Kopfteils verantwortlich^[146]. Daher wird das relative Graustufenwertvolumen V% dieser Untereinheiten mit Delta 2D ermittelt und die Summe dieser Werte den entsprechenden Monomeren und Oligomeren der ATP-Synthase näherungsweise als Proteinmenge

zugeordnet. Eine modifizierte Formel für die relative spezifische Aktivität von Komplex V ist im Folgenden dargestellt:

$$a_{spez,CN} = \frac{t_x - t_0}{(V\%_{\alpha} + V\%_{\beta}) \cdot F_2}$$

Wie in Abschnitt 4.11.2 werden die Graustufenwerte gegen die Zeit aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Die Steigung dieser Geraden stellt die relative spezifische Aktivität der entsprechenden Proteinbande in der Einheit GU pro Stunde dar. Auch hier werden nur die Daten der ersten 90 Minuten für die Auswertung verwendet.

4.12 Statistik

In den Diagrammen dieser Arbeit stellen die Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwertes dar. Bei diesem Fehler handelt es sich um ein Maß für die Streuung von Mittelwerten, wenn man theoretisch unendlich viele Stichproben aus einer Grundgesamtheit (n-Proben) entnehmen würde^[147].

Um zu überprüfen, ob zwischen zwei Proben signifikante Unterschiede auftreten, wird der Signifikanztest Student's t-Test eingesetzt. Hierfür wird das Excel Add-In Real Statistics Resource Pack (Version 4.4) von Charles Zaiontz verwendet. In dieser Arbeit wird ausschließlich der unabhängige Test mit zwei nicht verbundenen Stichproben durchgeführt^[148], beide Seiten der Gaußverteilung werden berücksichtigt. Bei der Nullhypothese H_0 wird davon ausgegangen, dass es keine Unterschiede zwischen den verwendeten Proben gibt ($H_0: \mu_1 = \mu_2$). Diese Hypothese wird nicht angenommen, wenn der Signifikanzwert p kleiner als 5 % oder 1 % ist. In diesem Fall spricht man bei einem Wert von $p < 0,05$ von einem statistisch signifikanten Unterschied (in Abbildungen gekennzeichnet mit *) oder bei einem Wert $p < 0,01$ von einem statistisch hochsignifikanten Unterschied (gekennzeichnet mit **).

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Charakterisierung von OxPhos-Komplexen aus tierischem Gewebe

Die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe (OxPhos-Komplexe) und Superkomplexe aus Herzmitochondrien von Rind^[1, 2] und Ratte^[3, 95, 145, 149] sind in unserer Arbeitsgruppe bereits charakterisiert worden, allerdings lagen bisher noch keine Daten zu den in dieser Arbeit erstmals untersuchten OxPhos-Komplexen aus Schwein-, Wildschwein- und Rehherz und Rehnieren vor. Für eine funktionelle Analyse dieser Komplexe wurde die native Gelelektrophorese (BN- und CN-PAGE) in Kombination mit In-Gel Aktivitätstest eingesetzt. Des Weiteren wurden die Proben mittels 2-D BN/SDS-PAGE aufgetrennt und die Untereinheiten der OxPhos-Komplexe durch "Peptid Mass Fingerprint" und 2-D Western Blots identifiziert. Für eine Quantifizierung dieser Untereinheiten wurden die 2-D Gele der Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro[®] Ruby gefärbt und mit der Software Delta2D ausgewertet.

5.1.1 Isolierung der Mitochondrien

Die Mitochondrien der verschiedenen Organismen (siehe Abschnitt 3.6.7) wurden nach dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen Protokoll von den Masterstudenten Olga Ankudin bzw. Victoria Petermann unter meiner Anleitung oder mir isoliert. Die Konzentrationen der mitochondrialen Proteine wurde mit der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt. In Tabelle 5.1 sind die erhaltenen Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 5.1: Isolierte Mitochondrien aus unterschiedlichen Organismen, die Konzentration der mitochondrialen Proteine wurde mit der Proteinbestimmung nach Assay ermittelt. Bei den Proben von Ratte und Maus handelt es sich um **gepoolte Proben** (^P, Maus 7 Herzen, Ratte jeweils 3 Herzen) und es wurde nur das Gesamtgewicht angegeben.

Gewebe	Organismus	Abk.	Gewicht des Gewebes [g]	Protein-konzentration [mg/mL]	Proteinmenge der Mitochondrien-Suspension [mg]
Herz	Rind	BHM	48,35	19,38	78,68
Herz	Rind	BHM _{FG}	42,17	12,91	59,51
Herz	Rind	BHM _{alt}	39,07	11,97	62,12
Herz	Schwein	PHM	56,66	24,04	97,36
Herz	Wildschwein	WHM	57,73	12,51	62,30
Herz	Reh	DHM	49,58	16,06	83,19
Herz	Ratte (Fischer)	R _F HM	2,62 ^P	20,51	25,64
Herz	Ratte (Wistar)	R _W HM	2,45 ^P	16,94	20,67
Herz	Maus	MHM	1,14 ^P	10,64	14,57
Niere	Reh	DKM	42,01	28,54	285,41

Die Bestimmung des optimalen Detergens/Protein-Verhältnisses der Proben bezogen auf die Ausbeute an solubilisierten mitochondrialen Proteinen bei Erhalt von übergeordneten

Strukturen (Superkomplexen,..) wurde im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] und Victoria Petermann^[90] durchgeführt.

5.1.2 Zuordnung von Proteinbanden in BN-Gelen

5.1.2.1 Herzmitochondrien aus Rind, Reh, Schwein und Wildschwein

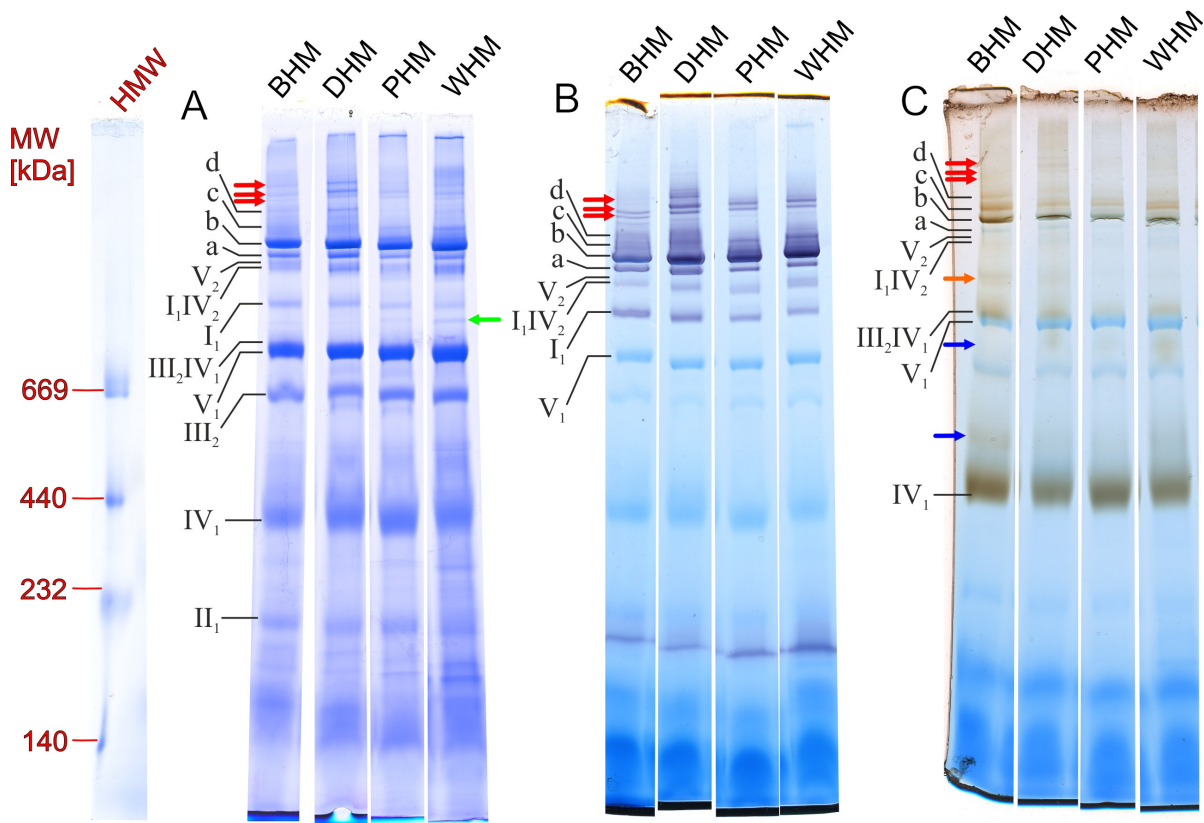


Abbildung 5.1: Zuordnung der Proteinbanden von solubilisierten Rinderherzmitochondrien (BHM), Rehherzmitochondrien (DHM), Schweineherzmitochondrien (PHM) und Wildschweinherzmitochondrien (WHM) auf einem Coomassie-gefärbten BN-Gel (A), einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (B) und für Komplex IV (C). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM, DHM, PHM und WHM auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Als Proteinmassenstandard wurden 4 µL des HMW-Markers (rot) auf das Gel gegeben. Es handelt sich hierbei um zusammengesetzte Gele, die vollständigen Gele sind im Anhang (**Abbildung 8.1**) dargestellt. Die farbigen Pfeile (rot, grün, blau und orange) deuten auf gewebespezifische Banden hin, die nur bedingt zugeordnet werden können. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

Rinderherzmitochondrien (BHM), Rehherzmitochondrien (DHM), Schweineherzmitochondrien (PHM) und Wildschweinherzmitochondrien (WHM) wurden mittels BN-PAGE untersucht (Abbildung 5.1). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM, DHM, PHM und WHM auf ein großes BN-Gel aufgetragen. Die Coomassie-Färbung (A) wurde nach Abschnitt 4.7.1, die In-Gel Aktivitätstests für Komplex I (B) und Komplex IV (C) wurden nach Abschnitt 4.8.1 und 4.8.2 durchgeführt. Bei den hier gezeigten Abbildungen handelt es sich jeweils um zusammengesetzte Gele, die vollständigen Gele sind im Anhang (Abbildung 8.1) dargestellt.

Die Zuordnung der Proteinbanden von BHM erfolgte nach Schägger *et al.*^[63, 150], Schäfer *et al.*^[1], Reifschneider *et al.*^[5] und Dudkina *et al.*^[151]. Ausgehend von diesen Veröffentlichungen können die Massen näherungsweise für die individuellen OxPhos-Komplexe wie folgt angegeben werden: 130 kDa für Komplex II₁, 200 kDa für Komplex IV₁, 500 kDa für Komplex III₂ (das immer als Dimer vorliegt), 750 kDa für Komplex V₁ und 1000 kDa für Komplex I₁. Die Massen der individuellen Komplexe, Superkomplexe und Homooligomere können dementsprechend berechnet werden. Daher ergeben sich für die in Abbildung 5.1 dargestellten Assemblierungen folgende Werte: 400 kDa für IV₂, 700 kDa für III₂IV₁, 1400 kDa für I₁IV₂, 1500 kDa für das Dimer V₂, 1500 kDa für Superkomplex a (I₁III₂), 1700 kDa für Superkomplex b (I₁III₂IV₁), 1900 kDa für Superkomplex c (I₁III₂IV₂) und 2100 kDa für Superkomplex d (I₁III₂IV₃).

Da in der Literatur keine Informationen zu den OxPhos-Komplexen der anderen Organismen (DHM, PHM, WHM) gefunden wurden, werden näherungsweise die gleichen Massen wie für BHM verwendet. In dem Coomassie gefärbten BN-Gel (Abbildung 5.1 A) ist zu erkennen, dass die mitochondrialen Membranproteine dieser Proben ein sehr ähnliches Laufverhalten aufweisen wie BHM. Auffällig ist bei allen Proben, dass auch oberhalb von Superkomplex d noch weitere Banden zu erkennen sind (**rote Pfeile**). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um gewebespezifische Superkomplexe mit einem höheren Assemblierungsgrad. Wie diese Komplexe zusammengesetzt sind, lässt sich nur schwer einschätzen, zum Einen findet man in der oben beschriebenen Literatur keine Hinweise auf diese Banden, zum Anderen liegen sie im oberen Abschnitt des Gradientegels, in dem nur noch eine unzureichende Auftrennung von Komplexen in einem Größenbereich von 2 - 3 MDa stattfindet^[117]. Ebenso fällt auf, dass besonders bei DHM die Intensität dieser Banden stärker ausgeprägt ist. Des Weiteren ist bei PHM und WHM zu erkennen, dass Superkomplex d deutlich weniger vorhanden ist und es eine weitere Bande zwischen dem Superkomplex III₂IV₁ und dem individuellen Komplex I₁ (**grüner Pfeil**) gibt. Bei DHM und PHM sind im Vergleich zu BHM und WHM weitere Banden oberhalb und unterhalb von Komplex III₂ zu erkennen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um höhere Oligomere von Komplex IV.

Der In-Gel Aktivitätstest von Komplex I (Abbildung 5.1 B) beruht auf der Bildung von violettem Formazan^[132] in den Proteinbanden des BN-Gels. Dadurch können folgende Banden zugeordnet werden (nach aufsteigender Masse): individueller Komplex I₁, Superkomplex I₁IV₂ und Superkomplexe a bis d. Die Färbeintensität dieser Banden ist bei den hier untersuchten Herzgeweben sehr hoch. Bei PHM und WHM ist die Intensität für den Superkomplex d schwächer als bei BHM und DHM. Ebenso konnte bestätigt werden, dass die Banden im höheren Bereich (über Superkomplex d, **rote Pfeile**) eine entsprechende Aktivität besitzen. Im Bereich um 140 kDa ist eine weitere violette Bande erkennbar. Hierbei kann es sich entweder um die Dehydrogenase-Untereinheit von Komplex I oder um eine andere mitochondriale Dehydrogenase handeln.

Anhand des In-Gel Aktivitätstests von Komplex IV (Abbildung 5.1 C) ist zu erkennen, dass die Superkomplexe b, c und d ein braunes Präzipitat (polymerisiertes oxidiertes DAB^[136]) gebildet haben. Im Gegensatz zu BHM sind bei DHM, PHM und WHM die Färbung der

Superkomplexe deutlich schwächer und Superkomplex d ist in dieser Darstellung nur schlecht zu sehen. Wie erwartet ist bei der Bande von Superkomplex a nur eine schwache Coomassie-Färbung zu erkennen. Die darüber liegenden Banden der Superkomplexe (**rote Pfeile**) weisen nur eine sehr schwache Intensität auf. Ähnlich wie bei der Coomassie-Färbung und dem Aktivitätstest für Komplex I sind diese Banden von DHM am besten zu erkennen. Diese qualitativen Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese höheren Assemblierungen unter anderem auch aus Komplex I und Komplex IV aufgebaut. Für genauere Charakterisierung sind weitere Experimente notwendig.

Die Bande für den individuellen Komplex IV₁ ist bei diesen Proben stark braun gefärbt. Der Superkomplex III₂IV₁ ist nur als braune verschmierte Bande zu erkennen. Trotz seiner geringeren Masse von 700 kDa ist dieser Komplex oberhalb der ATP-Synthase (V₁, 750 kDa) zu finden. Auch weitere Ergebnisse von MS-Daten und 2D Western Blots (Abschnitt 5.1.4) bestätigen diese unerwartete Beobachtung.

Des Weiteren sind Banden oberhalb von Komplex IV₁ und III₂ (**blaue Pfeile**) zu erkennen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Homooligomere von Komplex IV (z.B. IV₂ und IV₃). Bei BHM und WHM zeigen diese Banden eine höhere Intensität, bei PHM sind sie kaum noch zu erkennen. Eine weitere braune Bande ist oberhalb von Komplex I zu sehen (**orangener Pfeil**). In diesem Fall könnte es sich um den Superkomplex I₁IV₁ handeln.

5.1.2.2 Herzmitochondrien aus Maus und Ratte (Wistar und Fischer)

Mausherzmitochondrien (MHM), Rattenherzmitochondrien (Fischer R_FHM und Wistar R_WHM) wurden mittels BN-PAGE untersucht (Abbildung 5.2). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 4 g/g für MHM und 3 g/g für R_FHM und R_WHM) auf ein großes BN-Gel aufgetragen. Wie bereits in Abschnitt 5.1.1 erklärt, wurden diese Detergens/Protein-Verhältnisse im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] und Victoria Petermann^[90] ermittelt. Bei den hier gezeigten Abbildungen handelt es sich jeweils um zusammengesetzte Gele, die vollständigen Gele sind im Anhang (Abbildung 8.2) dargestellt. Die Zuordnung der Proteinbanden für RHM erfolgt nach Reifschneider^[5] und Frenzel^[145], für MHM nach Mourier *et al.*^[152].

In dem Coomassie gefärbten BN-Gel (Abbildung 5.2 A) ist zu erkennen, dass die solubilisierten Proteine aus den Herzmitochondrien der Fischer- und Wistar-Ratten ein nahezu identisches Laufverhalten besitzen. Im Vergleich treten bei MHM zahlreiche Unterschiede im Bandenmuster auf. Im Bereich des ATP-Synthase Dimers (V₂) bzw. des Superkomplexes I₁IV₂ ist bei MHM nur eine Bande mit geringer Intensität zu sehen. Bei beiden Spuren von RHM weist Superkomplex b die höchste Intensität auf, bei MHM ist dies Superkomplex a. Ebenso ist bei RHM eine eindeutige Zuordnung der Banden zu den Superkomplexen a bis d möglich. Bei den Herzmitochondrien aus Maus sind in diesem Bereich deutlich mehr Banden zu erkennen (genauere Zuordnung über Aktivitätstests). Des Weiteren ist eine Bande im höher molekularen Bereich (**roter Pfeil**) deutlich zu erkennen.

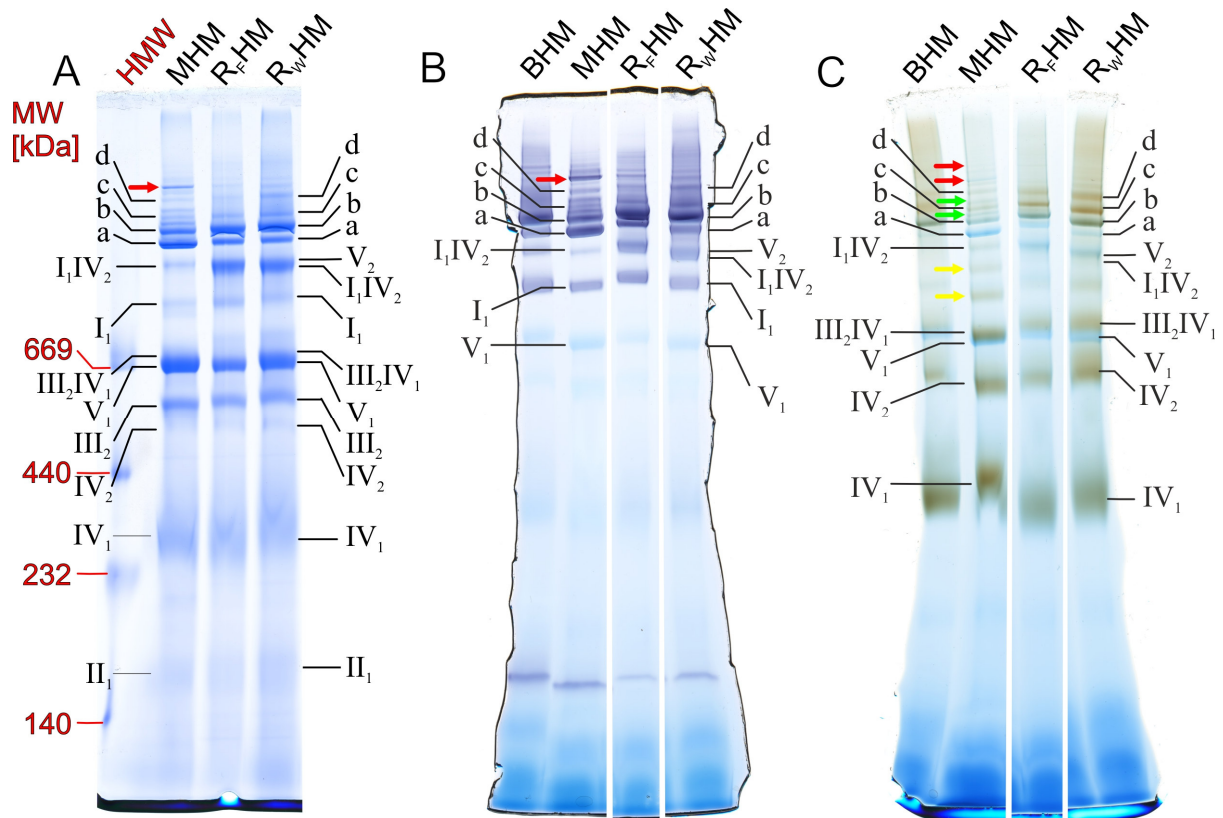


Abbildung 5.2: Zuordnung der Proteinbanden von solubilisierten Mauserherzmitochondrien (MHM) und Rattenherzmitochondrien (Fischer R_FHM und Wistar R_WHM) auf einem Coomassie-gefärbten BN-Gel (A), einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (B) und für Komplex IV (C). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 4 g/g für MHM und 3 g/g für R_FHM und R_WHM) auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Für die Coomassie-Färbung wurden 4 µL des HMW-Marker (rot) auf das Gel als Proteinmassenstandard aufgetragen, für die Aktivitätstests wurde BHM (100 µg vor Solub., 3 g/g) als Standard verwendet. Es handelt sich hierbei um zusammengesetzte Gele, die vollständigen Gele sind im Anhang (Abbildung 8.2) dargestellt. Die farbigen Pfeile (rot, grün und gelb) deuten auf Banden hin, die nur bedingt zugeordnet werden können. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

Durch den In-Gel Aktivitätstest von Komplex I (Abbildung 5.2 B) kann für R_FHM und R_WHM eine enzymatische Dehydrogenase-Aktivität des individuellen Komplexes I₁, des Superkomplexes I₁IV₂ und der Superkomplexe a bis d nachgewiesen werden. Bei MHM zeigt I₁IV₂ nur eine schwache violette Bande. Im Superkomplex-Bereich ist bei allen Banden eine Präzipitatbildung zu erkennen. Ebenso ist auch bei der Bande (roter Pfeil) oberhalb eine starke violette Bande zu sehen.

Im niedermolekularen Bereich um 66 kDa ist eine weitere violette Bande zu sehen. Es handelt sich wahrscheinlich, wie bereits in Abschnitt 5.1.2.1 besprochen, um eine Untereinheit von Komplex I oder um eine andere mitochondriale Dehydrogenase.

Bei dem In-Gel Aktivitätstest von Komplex IV (Abbildung 5.2 C) sind bei den Proben von Wistar-, Fischerratten und Mäusen braun gefärbte Banden im Bereich des individuellen Komplexes IV₁, des Dimers IV₂ und des Superkomplexes III₂IV₁ zu sehen. Bei Superkomplex a befindet sich nur eine schwach Coomassie-gefärbte Bande, dies ist besonders gut bei MHM zu erkennen. Die Superkomplexe b, c und d zeigen bei R_FHM und R_WHM Banden mit hoher

Intensität. Bei MHM fällt auf, dass in diesem Bereich nur bestimmte Banden eine vergleichbare Färbintensität aufweisen. Hierbei handelt es sich dementsprechend um die Superkomplexe b, c und d, die sowohl Komplex I als auch Komplex IV enthalten. Da die schwach Coomassie-gefärbten Banden (**grüne Pfeile**) keine enzymatische Komplex IV-Aktivität aufweisen, handelt es sich möglicherweise um Assemblierungen aus Komplex I und Komplex III oder anderen Komplexen. Auch bei der Bande oberhalb dieses Bereichs (**roter Pfeil**) konnte kein braunes Präzipitat gesehen werden. Um diese Komplexe genauer charakterisieren zu können sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

Des Weiteren sind bei MHM weitere Banden (**gelbe Pfeile**) im Bereich zwischen dem Superkomplex I_1IV_2 und III_2IV_1 zu erkennen. Da diese Banden bei dem Test von Komplex I keine enzymatische Aktivität zeigen handelt es sich möglicherweise um Superkomplexe der Form III_2IV_2 bzw. III_2IV_3 .

5.1.2.3 Mitochondrien aus Rehherz und Rehnier

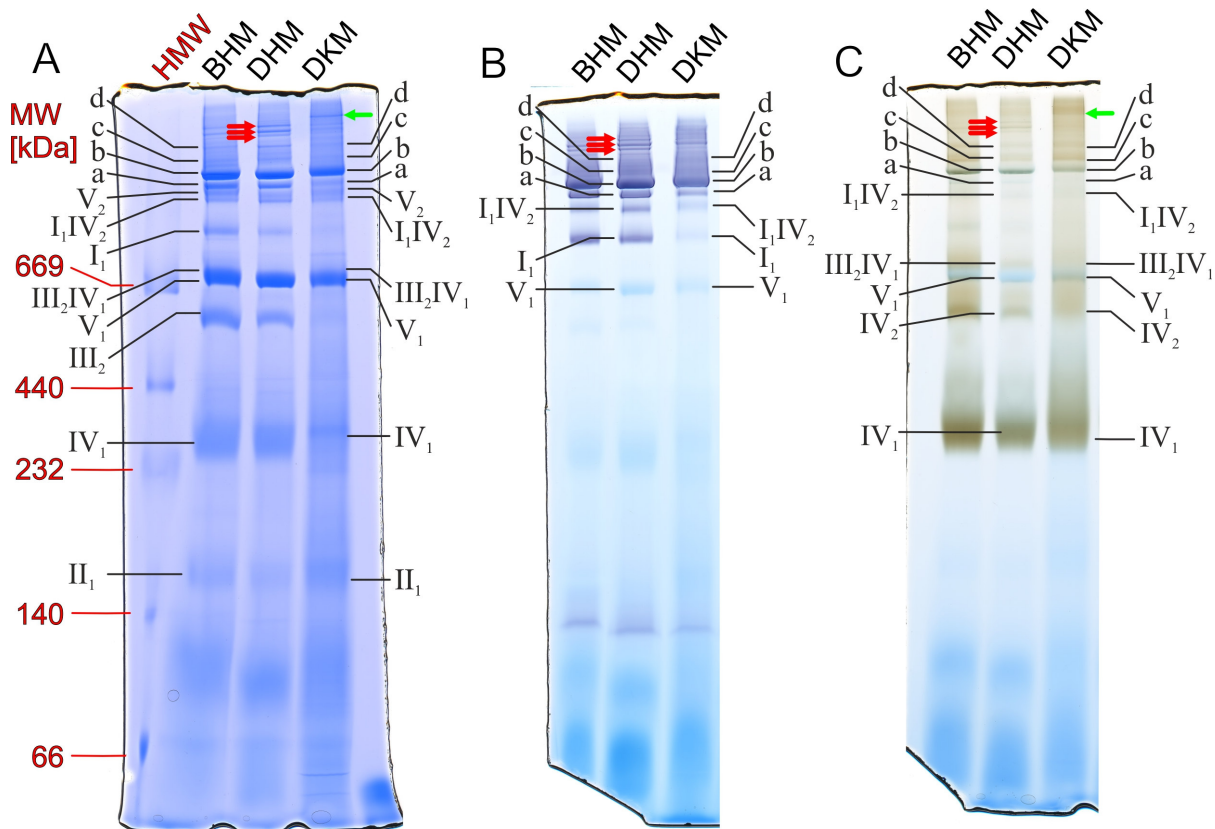


Abbildung 5.3: Zuordnung der Proteinbanden von solubilisierten Rehherzmitochondrien (DHM) und Rehnieremithondrien (DKM) auf einem Coomassie-gefärbten BN-Gel (A), einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (B) und für Komplex IV (C). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von DHM, DKM auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Als Proteinmassenstandard wurden 4 µL des HMW-Markers (rot) und BHM (100 µg vor Solub., 3 g/g) auf das Gel aufgetragen. Es handelt sich hierbei um zusammengesetzte Gele, die vollständigen Gele sind im Anhang (Abbildung 8.4) dargestellt. Die farbigen Pfeile (rot, und grün) deuten auf Banden hin, die nur bedingt zugeordnet werden können. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I_1III_2 , b = $I_1III_2IV_1$, c = $I_1III_2IV_2$, d = $I_1III_2IV_3$. Die hier gezeigten Gele wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] hergestellt.

Rehherzmitochondrien (DHM) und Rehnieremitochondrien (DKM) wurden mittels BN-PAGE untersucht (Abbildung 5.3). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von DHM und DKM auf ein großes BN-Gel aufgetragen.

Die Zuordnung der Proteinbanden auf dem Coomassie gefärbten BN-Gel (Abbildung 5.3) erfolgt analog zu Abschnitt 5.1.2.1. Bei DHM sind Banden für die individuellen Komplexe, die Superkomplexe a bis d, III_2IV_1 und I_1IV_2 , das ATP-Synthase Monomer und Dimer (V_1 und V_2) zu erkennen. Ebenso treten auch wieder die Banden oberhalb der Superkomplexe (rote Pfeile) auf. Das Bandenmuster von DKM zeigt im Vergleich dazu deutliche Unterschiede. Weder der individuelle Komplex III_2 noch der individuelle Komplex I_1 können in dem Gel zugeordnet werden. Die Bande für den individuellen Komplex IV_1 besitzt eine deutlich niedrigere Intensität als DHM bzw. BHM. Dies deutet darauf hin, dass diese Komplexe bei DKM zu einem deutlich größeren Teil in Form von Superkomplexen angeordnet sind. Im Gegensatz dazu haben Experimente von Reifschneider an Herz- und Nierenmitochondrien an Ratten^[5] gezeigt, dass bei beiden Geweben ein ähnliches Verteilungsmuster zwischen individuellen Komplexen und Superkomplexen vorliegen sollte. Ebenso ist im Bereich der Superkomplexe auffällig, dass nur bei Superkomplex b eine große deutlich erkennbare Bande zu sehen ist. Bei den Superkomplexen a, c und d handelt es sich nur um schwache und diffuse Banden.

Im Vergleich zu DHM liegt im Bereich oberhalb der Superkomplexe noch eine weitere Bande (grüner Pfeil), die zu deutlich höheren Massen verschoben ist. Hierbei handelt es sich entweder um einen Superkomplex mit einem noch höheren Assemblierungsgrad oder um ein Proteinaggregat.

Bei dem In-Gel Aktivitätstest von Komplex I (Abbildung 8.4 B) ergibt sich für DHM dasselbe Bandenmuster wie bereits in Abschnitt 5.1.2.1 beschrieben. Wie erwartet zeigt bei DKM der individuelle Komplex I_1 und der Superkomplex I_1IV_2 jeweils nur eine schwache violette Bande. Ebenso zeigt Superkomplex a von DKM eine vergleichsweise geringe Intensität. Die Banden der Superkomplexe b, c und d besitzen eine ähnliche Intensität wie bei DHM. Interessanterweise kann im hochmolekularen Bereich (grüner Pfeil) keine Bande eindeutig zugeordnet werden.

DHM und DKM zeigen bei dem In-Gel Aktivitätstest von Komplex IV (Abbildung 5.3 C) ein sehr ähnliches Muster der Präzipitatbildung. So können folgende Komplexe gefunden werden: der individuelle IV_1 , das Dimer IV_2 , Superkomplex III_2IV_1 und I_1IV_2 und die Superkomplexe a bis d. Interessanterweise zeigt die Bande oberhalb von Superkomplex d (grüner Pfeil) eine deutliche Komplex IV-Aktivität.

5.1.2.4 Herzmitochondrien aus Rind (verschiedene Bezugsquellen)

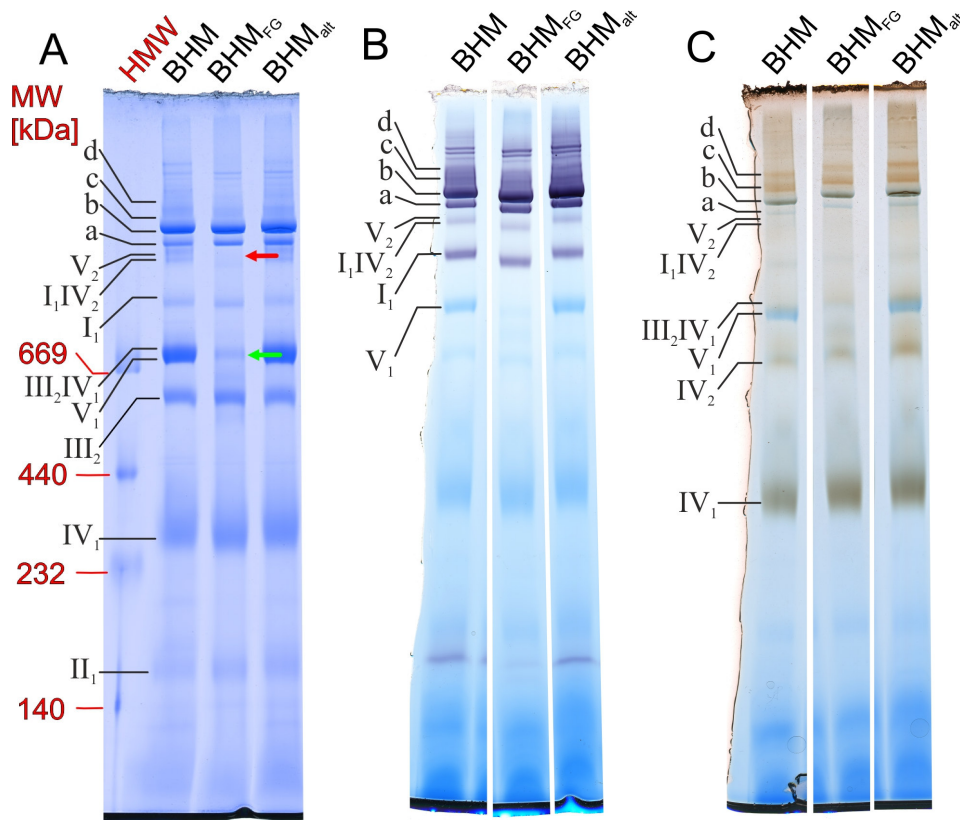


Abbildung 5.4: Zuordnung der Proteinbanden von solubilisierten Rinderherzmitochondrien (BHM), Rinderherz-mitochondrien alt (BHM_{alt}) und Rinderherzmitochondrien falsch gelagert (BHM_{FG}) auf einem Coomassie-gefärbten BN-Gel (A), einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (B) und für Komplex IV (C). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG} auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Als Proteinmassenstandard wurden 4 µL des HMW-Markers (rot) auf das Gel aufgetragen. Es handelt sich hierbei um zusammengesetzte Gele, die vollständigen Gele sind im Anhang (Abbildung 8.3) dargestellt. Die farbigen Pfeile (rot, und grün) deuten auf Banden hin, die nur bedingt zugeordnet werden können. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

Es wurden pro Spur jeweils 100 µg (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG} auf ein großes BN-Gel aufgetragen (Abbildung 5.4).

Die Proteinbanden werden analog zu Abschnitt 5.1.2.1 zugeordnet. Da im Rahmen dieser Arbeit viele Präparationen an BHM durchgeführt wurden, sollen hier sowohl die Einflüsse einer Langzeitlagerung von Gewebe bei -80 °C (von November 2003, BHM_{alt}) als auch die Auswirkungen der Lagerung von Gewebe bei einer zu hohen Temperatur (-20 °C, BHM_{FG}) nach Entnahme des Herzens untersucht werden.

In Abbildung 5.4 A ist zu erkennen, dass es zwischen BHM und BHM_{alt} nur geringe Unterschiede gibt. Im Gegensatz dazu ist bei BHM_{FG} weist die Bande des Monomers der ATP-Synthase (grüner Pfeil) eine deutlich geringere Intensität. Ebenso ist im Bereich des Dimers von Komplex V (roter Pfeil) keine Bande zu sehen. Einen Fehler bei der

Solubilisierung oder bei dem BN-Gellauf konnte dadurch ausgeschlossen werden, dass dieses Experiment mehrmals wiederholt worden ist (Daten nicht gezeigt). Einen Grund für die geringe Menge an ATP-Synthase könnten auf eine Degradation von Komplex V (bedingt durch proteolytische Abbauprozesse) hindeuten, die auf eine unzureichend Kühlung nach der Entnahme des Gewebes zurückzuführen sind. Hierbei stellt sich allerdings die Frage, warum nur die ATP-Synthase betroffen zu sein scheint.

Major *et al.*^[153] hat die Einflüsse von Temperatur auf das mitochondriale Proteom des Hefestamms *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Hierfür wurden isolierte Mitochondrien für 4 Stunden bei 30 °C oder 39 °C inkubiert und anschließend die Proteinspots auf 2-D SDS-Gelen quantifiziert. So zeigen sich unter anderem für die Proteinmengen der Untereinheiten α und β nur geringe Veränderungen bei diesen Temperaturen. Andere Beispiele für eine gerichtete Degradation der ATP-Synthase stehen meist in Zusammenhang mit Mutationen auf DNS-Ebene. So sind das Leigh-Syndrom^[154] und auch NARP-Syndrom (Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa)^[155] auf Mutationen in der mitochondrialen DNS, genauer Gen MT-ATP6 codierend für Untereinheit a der ATP-Synthase, zurückzuführen.

Chen *et al.*^[156] haben den Einfluss einer 3-monatigen Lagerung von isolierten Mitochondrien (*Caenorhabditis elegans*) auf die OxPhos-Komplexe untersucht. Die Proben wurden für 1 bis 3 Monate bei -80 °C aufbewahrt und mehrmals bei 4 °C aufgetaut und wieder eingefroren (höchstens 4 Einfrier/Auftauzyklen). Es konnten keine Unterschiede in der enzymatischen Aktivität von Komplex I und IV gefunden werden.

Die Aktivitätstests für Komplex I und IV (Abbildung 5.4 B und C) zeigen interessanterweise keine größeren Unterschiede. Es können alle Banden für die individuellen Komplexe und die Superkomplexe zugeordnet werden. Des Weiteren ist zu erkennen, dass bei allen Spuren die farbigen Präzipitate eine ähnliche Intensität aufweisen. Dies würde für BHM_{FG} bedeuten, dass die Lagerung bei einer falschen Temperatur keinen Einfluss auf die Aktivität der Komplexe und Superkomplexe hat. Ebenso ist eine Degradation der Superkomplexe nicht zu beobachten. Interessanterweise zeigt auch BHM_{alt}, das für 11 Jahre bei -80 °C gelagert wurde, keine großen Veränderungen in Bezug auf die Komplex I- und IV-Aktivitäten und das Verhältnis von individuellem Komplex zu Superkomplex (im Vergleich zu BHM).

5.1.2.5 Western Blots von BN-Gelen

Für die Western Blots wurden 30 µg mitochondriales Protein (vor Solub.) von BHM, PHM, WHM, R_FHM, R_WHM, MHM, DHM und DKM auf ein mittleres BN-Gel aufgetragen. Für MHM war das Digitonin/Protein-Verhältnis 4 g/g, ansonsten 3 g/g. Die Blots wurden, wie in Abschnitt 4.9 beschrieben, im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] durchgeführt. Die Antikörper sind in Tabelle 4.31 bzw. 4.32 aufgeführt. Laut Angaben des Herstellers wurden die Antikörper gegen Komplex III, IV und V an Proben aus Mensch, Maus, Ratte und Rind getestet. Nur der Antikörper gegen Komplex I wurde laut Hersteller nicht an Rind getestet.

Das BN-Gel (Abbildung 5.5 A) zeigt ein ähnliches Bandenmuster wie bereits in vorherigen Abschnitten beschrieben. Die Solubilisate aus BHM, PHM, WHM, DHM, und DKM zeigen ein ähnliches Laufverhalten. Der individuelle Komplex III_2 , V_1 und die Superkomplexe I_1III_2 (a), $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_1$ (b) und $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_2$ (c) sind gut zu sehen. Bei den Superkomplexen ist b die Bande mit der höchsten Färbintensität. Ebenso sind auch wieder die Banden oberhalb von Superkomplex d (rote Pfeile) deutlich zu sehen. Im Gegensatz dazu ist bei MHM zu erkennen, dass die Superkomplexe a und b eine ähnliche Intensität besitzen. Bei R_F HM und R_W HM tritt zusätzlich eine weitere intensive Bande unterhalb von I_1III_2 auf, hierbei handelt es sich wahrscheinlich um das Dimer von Komplex V bzw. dem Superkomplex I_1IV_2 .

Anhand des Western Blots gegen die 75 kDA Untereinheit NDUS1 (Komplex I) können der individuelle Komplex I_1 , der Superkomplex I_1IV_2 und die Superkomplexe a bis d bei allen Proben (außer DKM) nachgewiesen werden. Bei DKM zeigen nur die Banden im Superkomplex-Bereich einen positiven Nachweis. Dies bestätigt die aus dem Aktivitätstest für Komplex I (Abbildung 5.3 B) erhaltenen Ergebnisse, dass bei DKM Komplex I hauptsächlich in Form von Superkomplexen vorliegt.

Bei dem Blot für Komplex III können für PHM und WHM keine Proteine nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass diese beiden artverwandten Proben eine sehr ähnliche Proteinzusammensetzung für Komplex III haben, die geringfügig von den anderen abweicht und der verwendete Antikörper nicht spezifisch an diese bindet. Die anderen Proben (BHM, R_F HM, R_W HM, MHM, DHM und DKM) zeigen wie erwartet einen Nachweis für den individuellen Komplex III_2 , den Superkomplex III_2IV_1 und die Superkomplexe a bis d. Bei DKM ist wiederum zu erkennen, dass der individuelle Komplex im Vergleich zum Superkomplex nur eine sehr geringe Intensität besitzt.

Der Western Blot gegen COX1 (Komplex IV) kann nur unter Vorbehalt ausgewertet werden. Es hat sich bei verschiedenen Experimenten gezeigt, dass der hier verwendete Antikörper mit Antikörper gegen Komplex V verunreinigt war. Nichts desto trotz können im niedermolekularen Bereich Banden für den individuellen Komplex IV_1 , das Dimer IV_2 und den Superkomplex III_2IV_1 nachgewiesen werden. Im Bereich der Superkomplexe a bis d ist eine Zuordnung nur bedingt möglich, da die Banden außer bei R_F HM, R_W HM und MHM stark verschmiert sind.

Anhand des Blots für Komplex V können Banden für das Monomer V_1 , das Dimer V_2 , das Trimer V_3 und das Tetramer V_4 nachgewiesen werden. Bei den Proben aus Ratte und Maus sind die Banden deutlich schwächer zu erkennen. Da der Antikörper spezifisch für diese Organismen sein sollte (s.o.), könnte ein Grund in einer unzureichenden Proteinmenge während des Transfers auf die PVDF sein.

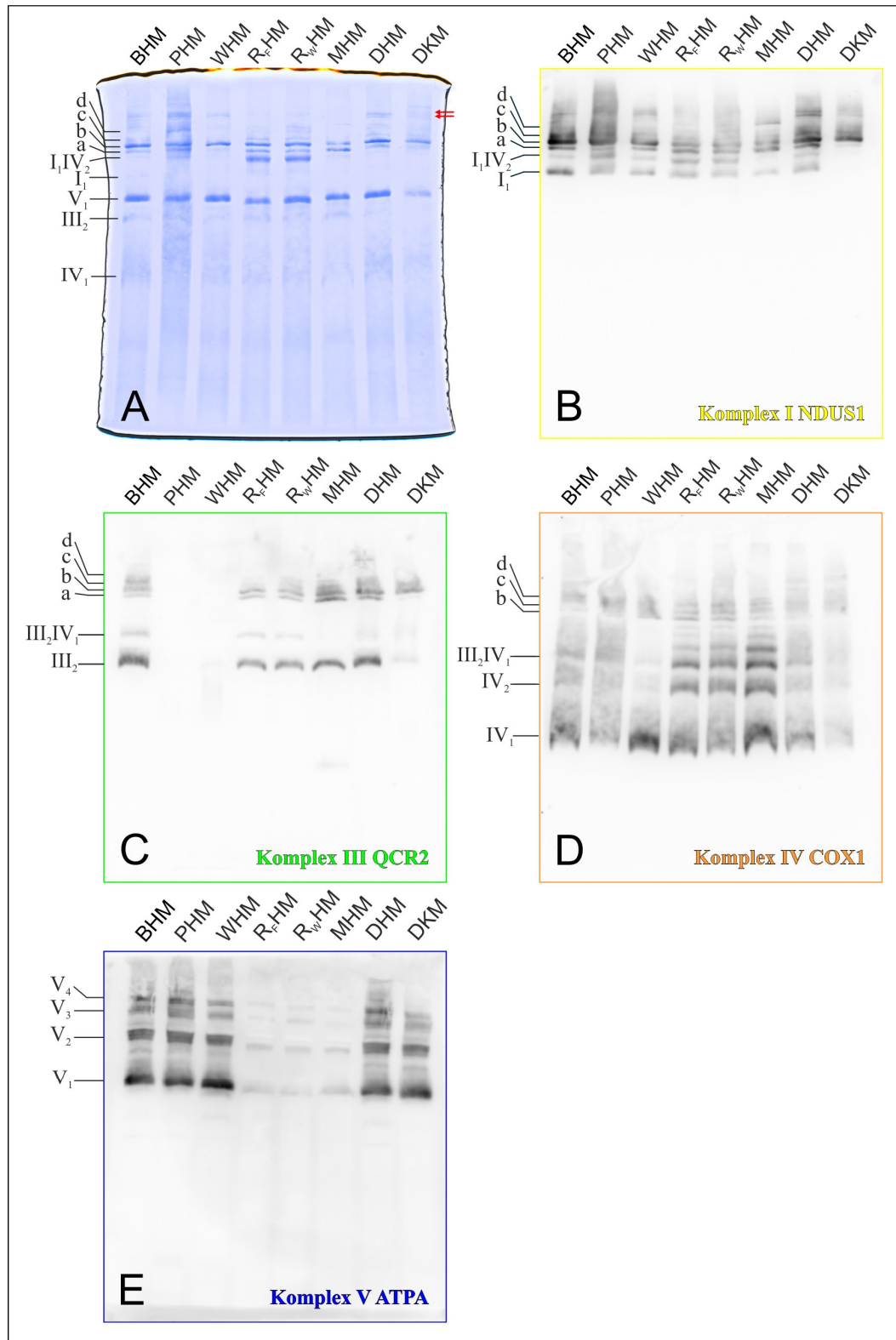


Abbildung 5.5: 1-D BN Western Blots der OxPhos-Komplexe I, III, IV und V von BHM, PHM, WHM R_FHM, R_WHM, MHM, DHM und DKM. Es wurden 30 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 4 g/g für MHM, für die anderen Proben 3 g/g) auf ein mittleres BN-Gel (10 cm x 10,5 cm, T = 3 - 13 %, C = 3 %) aufgetragen. **A:** Coomassie-gefärbtes BN-Gel nach dem Blotten. **B:** Western Blot gegen NDUS1 (Komplex I); **C:** Western Blot gegen QCR2 (Komplex III); **D:** Western Blot gegen COX1 (Komplex IV), Verunreinigung mit Antikörper gegen Komplex V; **E:** Western Blot gegen ATPA (Komplex V). Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃. Diese Western Blots wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] durchgeführt.

5.1.3 Quantitativer In-Gel Aktivitätstests für Komplex I und IV

5.1.3.1 Auswertung

Für die Quantitative Auswertung von In-Gel Aktivitätstests wird wie in Abschnitt 4.8.1 (Komplex I) bzw. 4.8.2 (Komplex IV) vorgegangen. Das Gel wird nach der Elektrophorese in einer Färbeschale mit Aktivitätstest-Lösung inkubiert und zu festgelegten Zeitpunkten wird ein 16-bit Graustufenbild (Auflösung 600 dpi) mit dem Bio-Imaging-System ViewPix 900 (Biostep/Epson) aufgenommen. Für einen Komplex-I-Aktivitätstest wird während der ersten 30 Minuten ein Graustufenbild des Gels alle 3 Minuten aufgenommen, danach alle 5 Minuten. Für Komplex IV wird alle 5 Minuten ein Graustufenbild aufgenommen. Dann wird das Gel für 30 Minuten in der Stopplösung (Abschnitt 4.8.1) geschwenkt. Im Folgenden wird die Auswertung am Beispiel eines Aktivitätstests für Komplex I gezeigt. Eine ähnliche Vorgehensweise erfolgt bei einem Test für Komplex IV.

In Abbildung 5.6 sind ausgewählte Bilder des Aktivitätstests für Komplex I von BHM (100 µg vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) dargestellt. Sowohl bei dem individuellen Komplex I₁ als auch bei den Superkomplexen kann die Zunahme an Präzipitat durch eine Zunahme des Graustufenwertes verfolgt werden.

Alle aufgenommenen Graustufenbilder werden anschließend mit der Software Delta2D ausgewertet. Für eine bessere Zuordnung der Banden sind auch 24 bit Farbbilder zu den Zeitpunkten $t = 0$ Minuten und $t = 60$ Minuten gezeigt. Die weitere Auswertung wird wie in Abschnitt 4.11.2 beschrieben durchgeführt. Nachdem der Graustufenwert für jeden Zeitpunkt ermittelt worden ist, findet eine erste Normierung auf die Proteinmenge des jeweiligen Komplexes und Superkomplexes in dem BN-Gel statt. Da für die Präzipitatbildung jeweils nur die aktive Untereinheit eines individuellen Komplexes verantwortlich ist, darf auch nur dieser Anteil des Superkomplexes in die Berechnung der Aktivität einfließen (zweite Normierung). Bei einem Quantitativen Aktivitätstest für Komplex IV wird eine weitere Normierung auf die Anzahl der im Superkomplex enthaltenen Kopien des individuellen Komplexes IV₁ vorgenommen (Abschnitt 4.11.2). Dann werden diese normierten Graustufenwerte (Grey Unit normiert, GU_{normiert}) für jeden Komplex und Superkomplex gegen die Zeit aufgetragen und anschließend wird eine lineare Regression durchgeführt. Die Steigung dieser Geraden stellt die relative spezifische Aktivität der entsprechenden Proteinbande in der Einheit GU_{normiert} pro Minute dar.

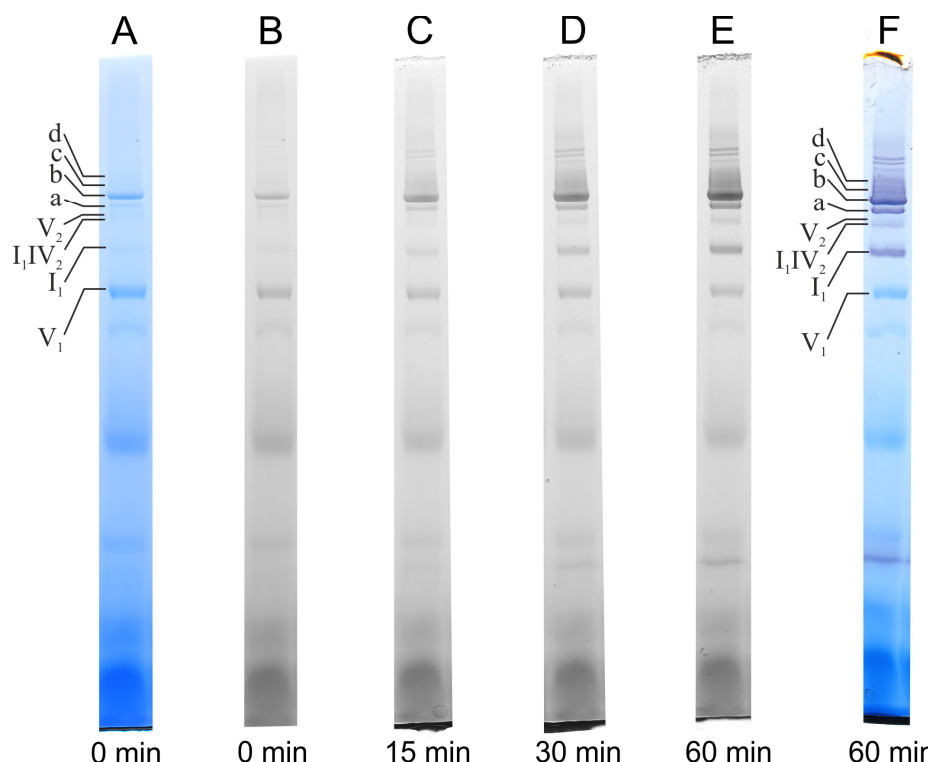


Abbildung 5.6: Quantitativer In-Gel Aktivitätstest für Komplex I von BHM. Die hier gezeigte Gelstreifen stammt von dem Aktivitätstest des BN-Gels im Anhang Abbildung 8.1 B. Es wurden 100 µg (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Bei B, C, D und E handelt es sich um 16 bit Graustufenbilder (Auflösung 600 dpi), die für die Auswertung mit der Software Delta2D von Decodon verwendet werden. Zu erkennen ist die zeitabhängige Zunahme des Präzipitats auf den Gelbänden. Zur Veranschaulichung sind 24 bit Farbbilder (Auflösung 600 dpi) bei t = 0 min (A) und bei t = 60 min (F) gezeigt. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I_1III_2 , b = $I_1III_2IV_1$, c = $I_1III_2IV_2$, d = $I_1III_2IV_3$.

Um eine Aussage darüber zu treffen, ob während des Aktivitätstests eine Entfärbung der Banden stattfindet und ob andere Komplexe mit dem Substrat in der Lösung reagieren, wird als Kontrolle die relative spezifische Aktivität von Komplex V untersucht. Diese Bande besitzt keine NADH-Dehydrogenase Aktivität und weist wie in Abbildung 5.6 zu sehen eine ausreichend starke Coomassie-Färbung zum Zeitpunkt t = 0 Minuten auf. Wie in Abbildung 5.7 A zu erkennen, kommt es während der gesamten Messdauer zu keiner Veränderung der Komplex-V-Bande.

In Abbildung 5.7 B sind die relativen spezifischen Komplex-I-Aktivitäten des individuellen Komplexes I_1 , des Superkomplexes I_1IV_2 und der Superkomplexe a bis d beispielhaft für alle Zeitpunkte dargestellt. Es werden jeweils 3 technische Replikate (n = 3, aus der gleichen Solubilisierung) auf ein Gel aufgetragen. Aus den erhaltenen relativen spezifischen Aktivitäten dieser Replikate werden die Mittelwerte berechnet und als Balkendiagramme dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler dar. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Ein statistisch signifikanter Unterschied wird mit stat. sig. abgekürzt, ein nicht signifikanter Unterschied mit stat. n. sig..

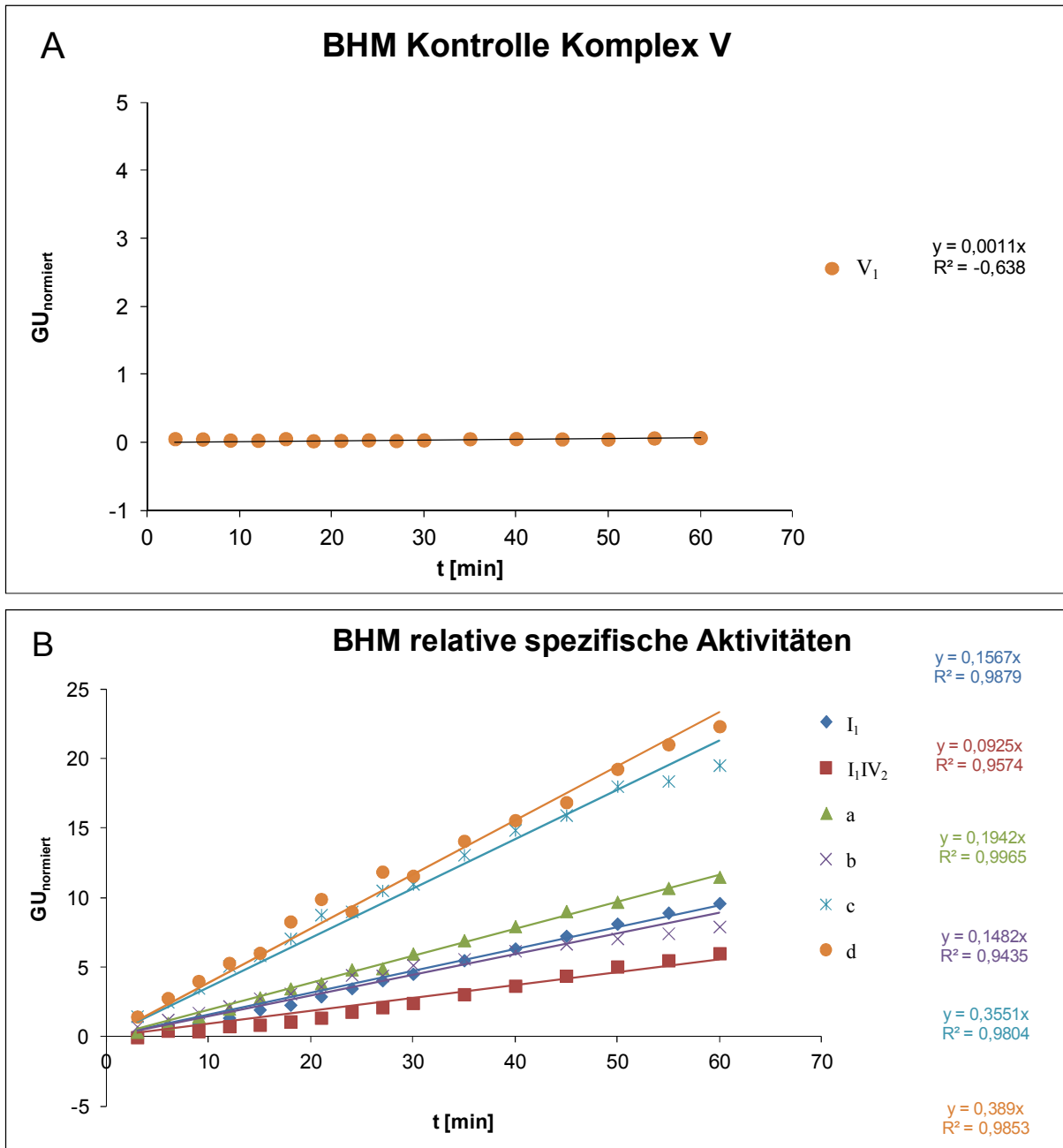


Abbildung 5.7: relative spezifische Aktivitäten von Komplex I enthaltenden Assemblierungen eines Aktivitätstests für Komplex I von BHM. In A ist als Kontrolle die Bandenintensität von Komplex V dargestellt, wie erwartet kann keine Komplex-I-Aktivität ermittelt werden. In B sind die die Aktivitäten des individuellen Komplexes I_1 , des Komplexes I_1IV_2 und der Superkomplexe a bis d gezeigt. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I_1III_2 , b = $I_1III_2IV_1$, c = $I_1III_2IV_2$, d = $I_1III_2IV_3$. Aufgetragen sind die Graustufenwerte (GU_{normiert}) gegen die Zeit in Minuten. Es wurde eine lineare Regression vorgenommen und die Geradensteigung und R^2 berechnet. Es ist zu erkennen, dass für BHM die Superkomplexe c und d mit Abstand die höchste spezifische Aktivität besitzen. Des Weiteren ist bei einem Vergleich zwischen den Aktivitäten des individuellen Komplexes und der Superkomplexe zu sehen, dass Komplex I in a, c und d eine höhere Aktivität zeigt als in seiner individuellen Form.

5.1.3.2 Herzmitochondrien aus Rind, Reh, Schwein und Wildschwein

Eine qualitative Auswertung eines Komplex-I-Aktivitätstests von BHM, DHM, PHM und WHM wurde bereits in Abschnitt 5.1.2.1 (Abbildung 5.1 B) vorgenommen. Dort zeigte sich, dass alle Proben ein sehr ähnliches Verteilungsmuster bei den Komplex I enthaltenden Banden aufweisen. Das zugehörige Gelbild dieses Aktivitätstests ist im Anhang (Abbildung 8.1 B) gezeigt. Es wurden pro Spur (jeweils technische Replikate, $n = 3$) 100 μg (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM, DHM, PHM und WHM auf ein großes BN-Gel gegeben.

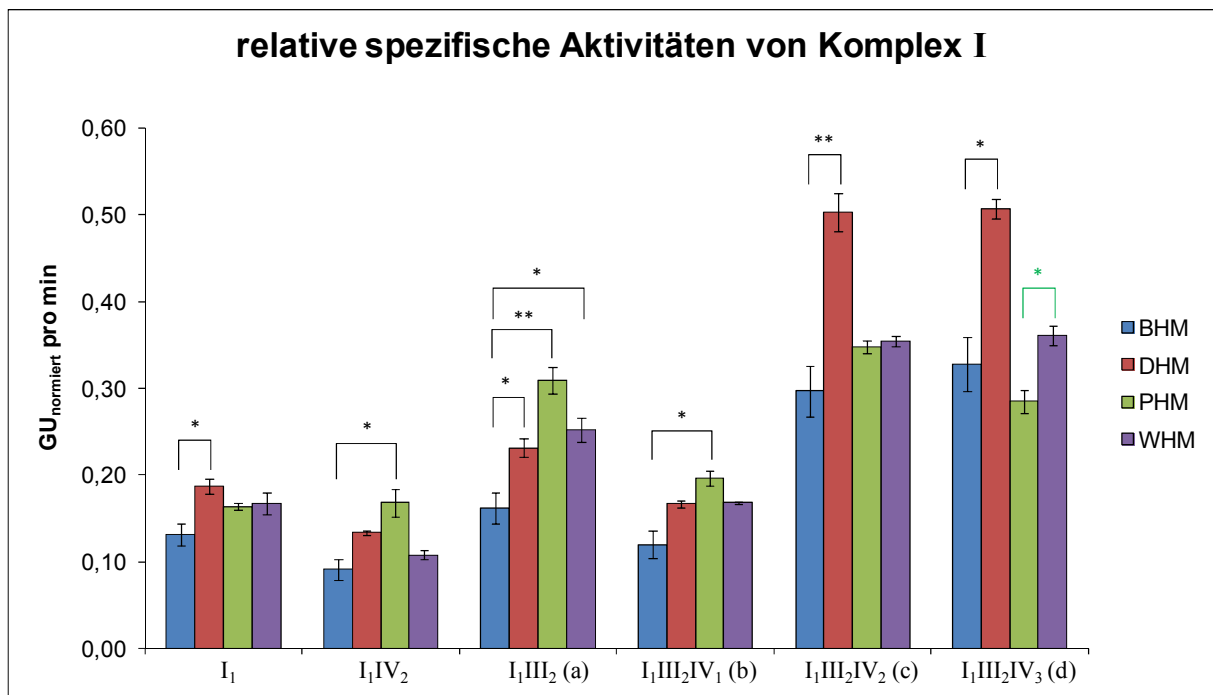


Abbildung 5.8: relative spezifische Aktivitäten von Komplex I für BHM, DHM, PHM und WHM. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang (Abbildung 8.1 B). Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate ($n = 3$) der spezifischen Aktivitäten in Graustufenwerten pro Minute ($\text{GU}_{\text{normiert}}$ pro min). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM), grüne Sterne zeigen den Vergleich zwischen PHM und WHM.

Da BHM sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in der Literatur als Standard für die Untersuchung von OxPhos-Komplexen in Mitochondrien dient, werden die in Abbildung 5.8 dargestellten Aktivitäten von DHM, PHM und WHM mit BHM verglichen (* bzw. **). Des Weiteren wird ein Vergleich zwischen PHM und WHM (* bzw. **) vorgenommen. Beide Tiere gehören zur Gattung der Echten Schweine (Suidae) aus der Ordnung der Paarhufer^[157].

In Abbildung 5.8 sind die relativen spezifischen Aktivitäten des individuellen Komplexes I₁, des Komplexes I₁IV₂ und der Superkomplexe I₁III₂ (a), I₁III₂IV₁ (b), I₁III₂IV₂ (c) und I₁III₂IV₃ (d) dargestellt. Zuerst sollen die Unterschiede zwischen den verschiedenen Organismen diskutiert werden, anschließend wird auf die Verhältnisse zwischen individuellem Komplex und Superkomplex näher eingegangen.

Bei DHM ist sehr deutlich zu sehen, dass im Vergleich zu BHM die Aktivität von Superkomplex c um den Faktor 1,7 (stat. sig.) und von Superkomplex d um den Faktor 1,5 (stat. sig.) größer ist. Bei PHM und WHM fallen die Unterschiede deutlich kleiner aus, im Mittel zwischen 10 und 20 % (stat. n. sig.). Vergleicht man PHM und WHM untereinander, so ergibt sich nur für Superkomplex d ein statistisch signifikanter Unterschied in der Aktivität um das 1,3 fache.

Ebenso sind weitere Unterschiede bei dem Superkomplex a zu erkennen. Hier besitzt BHM wie auch bei den anderen Superkomplexen die niedrigste spezifische Aktivität. Die Aktivitäten sind bei DHM um den Faktor 1,43, bei PHM um 1,91 und bei WHM um 1,55 (alle stat. sig.) deutlich größer.

Im Folgenden sollen die relativen spezifischen Aktivitäten zwischen dem individuellen Komplex I₁ und den Superkomplexen a, b, c und d verglichen werden. Es ist zu erkennen, dass bei BHM, DHM, PHM und WHM die Superkomplexe c und d die höchste spezifische Aktivität besitzen. Während der Superkomplex a eine etwas höhere Aktivität als der individuelle Komplex I₁ besitzt, zeigt Superkomplex b relativ ähnliche Werte im Bereich 0,12 bis 0,19 GU pro min (abhängig vom Organismus). Betrachtet man das statistische Mittel über alle Proben, so ergibt sich für die Superkomplexe folgende Beziehung zu dem Komplex I₁: Superkomplexe a ist um den Faktor 1,46 aktiver, Superkomplex c um den Faktor 2,41 bzw. Superkomplex d um den Faktor 2,27. Für Superkomplex b ist die Aktivität identisch zu der Aktivität des individuellen Komplexes (Faktor 1,00).

Wernicke *et al.*^[158] haben für die Komplex I aus Rattenhirnmitochondrien (Gewebe: Striatum) gezeigt, dass die Superkomplexe c und d eine um den Faktor 1,5 bis 2,0 höhere spezifische Aktivität aufweisen als der individuelle Komplex I₁. Die Untersuchungen von Kuter *et al.*^[159] bestätigen diese Ergebnisse für Komplex I aus Rattenhirnmitochondrien (Gewebe: Striatum, Substantia nigra). Sie fanden für Superkomplex c sogar eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 2,8.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für andere Organismen in den Arbeiten von Muschol (*Podospora anserina*)^[160] und Koziel *et al.* (Humane Endothelzelllinie)^[161] veröffentlicht.

Die gesamte relative spezifische Aktivität von Komplex I ist in Abbildung 5.9 dargestellt. Es fällt auf, dass DHM im Vergleich zu BHM eine deutlich größere Aktivität besitzt (Faktor 1,5, stat. sig.). Ebenso ist zu erkennen, dass PHM und WHM eine tendenziell höhere Aktivität besitzen (stat. n. sig.). Vergleicht man die Daten von PHM und WHM miteinander ist zu sehen, dass die Werte sehr ähnlich sind (wie bereits im vorherigen Abschnitt gezeigt.)

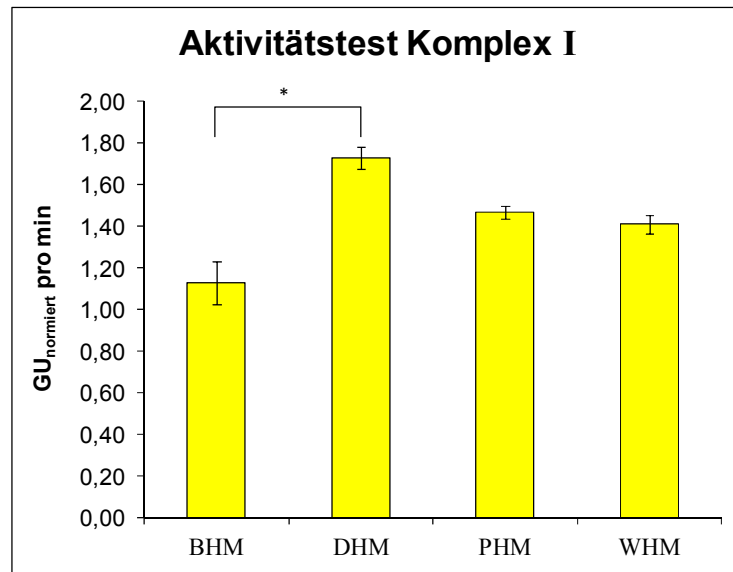


Abbildung 5.9: Gesamtsumme der relativen spezifischen Aktivitäten für Komplex I von BHM, DHM, PHM und WHM. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate ($n = 3$) der Summe der spezifischen Aktivitäten. Die Signifikanzniveaus sind identisch mit **Abbildung 5.8**. Der schwarze Sterne zeigt den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM).

Im Folgenden werden die Ergebnisse des quantitativen Aktivitätstests für Komplex IV dargestellt. Für eine Zuordnung der Banden und eine qualitative Auswertung wird auf Abschnitt 5.1.2.1 (Abbildung 5.1 C) verwiesen. Für den Aktivitätstest wurden 100 μg von BHM, DHM, PHM und WHM (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) auf ein großes BN-Gel gegeben. Pro Probe wurden jeweils 3 technische Replikate ($n = 3$) hergestellt. Das entsprechende Gel ist im Anhang (Abbildung 8.1 C) dargestellt.

In Abbildung 5.10 sind die relativen spezifischen Aktivitäten des individuellen Komplexes IV_1 , des Komplexes III_2IV_1 , des Komplexes I_1IV_2 und der Superkomplexe b, c und d gezeigt. Die Bande für das Dimer IV_2 konnte in diese Auswertung nicht mit einbezogen werden, da keine eindeutige Zuordnung bei allen Proben möglich war.

Bei den dargestellten Aktivitäten ist zu erkennen, dass der individuelle Komplex IV_1 die mit Abstand niedrigste spezifische Aktivität besitzt. Ein Vergleich von BHM, DHM, PHM und WHM zeigt, dass die Aktivitäten in einem ähnlichen Bereich (0,25 $\text{GU}_{\text{normiert}}$ pro min) liegen. Bei den Superkomplexen III_2IV_1 und I_1IV_2 sind deutliche Unterschiede zu sehen, diese sind aufgrund der großen Fehlerbalken bei BHM (und PHM für III_2IV_1) allerdings nicht statistisch signifikant. Im Vergleich zu BHM besitzen DHM und PHM bei Superkomplex b im Mittel eine um den Faktor 0,26 (stat. n. sig.) niedrigere und bei Superkomplex c eine um den Faktor 0,29 (stat. sig.) niedrigere Aktivität. Vergleicht man PHM und WHM, so ergibt sich für Superkomplex b ein Unterschied von 10 % (stat. sig.) bzw. für Superkomplex c 43 % (stat. n. sig.).

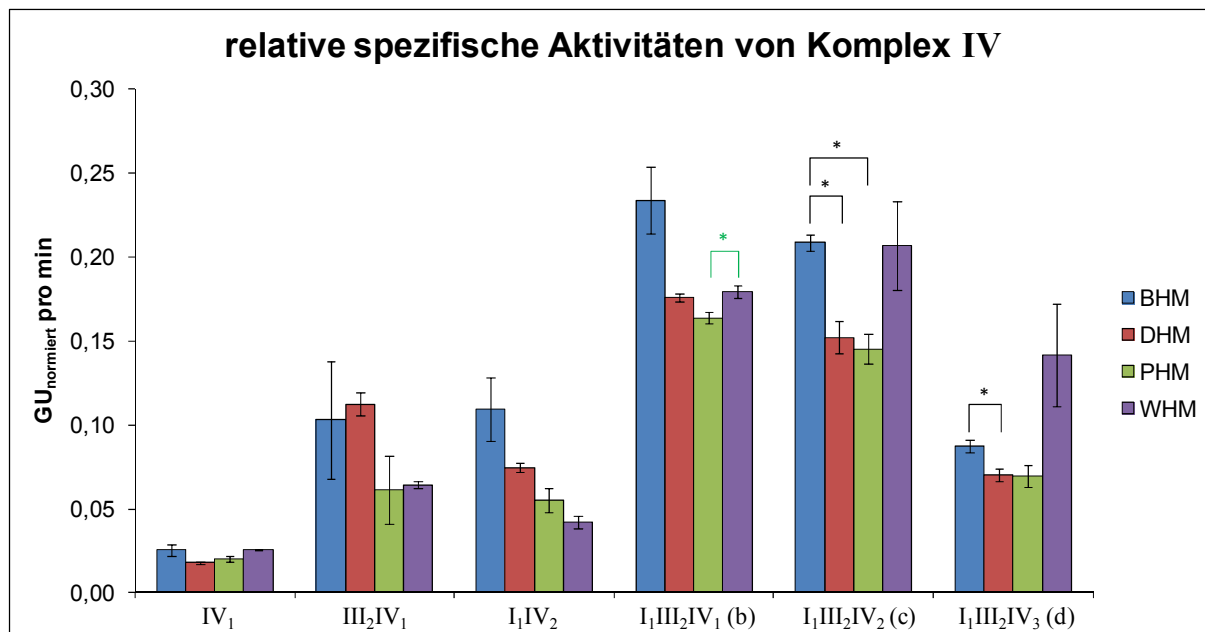


Abbildung 5.10: relative spezifische Aktivitäten für Komplex IV von BHM, DHM, PHM und WHM. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang (Abbildung 8.1 C). Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate ($n = 3$) der spezifischen Aktivitäten in normierten Graustufenwerten pro Minute ($\text{GU}_{\text{normiert}} \text{ pro min}$). Die Signifikanzniveaus sind identisch mit **Abbildung 5.8**. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM), **grüne Sterne** zeigen den Vergleich zwischen PHM und WHM.

Ein Vergleich zwischen der relativen spezifischen Aktivität von Komplexes IV in der individuellen Form und den Superkomplexen zeigt den gleichen Trend, der schon bei Komplex I beobachtet werden konnte. Vergleicht man die Diagramme in Abbildung 5.8 und 5.10, so ist zu erkennen, dass für den Komplex IV dieser Unterschied deutlich größer ist. Hier führt eine Assemblierung der Komplexe zu übergeordneten Strukturen zu einer deutlich stärkeren Zunahme der enzymatischen Aktivität. So zeigen die Superkomplexe I₁III₂IV₁ (b) und I₁III₂IV₁ (c) bei allen Proben die höchsten spezifischen Aktivitäten. Dementsprechend stellen sich diese Steigerungen der Aktivitäten im Vergleich zu Komplex IV₁ folgendermaßen dar (Mittelwerte): Superkomplex b um den Faktor 8,50, Superkomplex c um den Faktor 7,96 und Superkomplex d um den Faktor 4,07.

Kuter *et al.*^[159] haben für Komplex IV in Rattenhirnmitochondrien sogar gefunden, dass Komplex IV in Superkomplex c und d eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 16,2 bzw. 14,2 zeigen (im Vergleich zu dem individuellem Komplex IV₁). Muschol^[160] hat für den Pilz *Podospora anserina* gezeigt, dass die Assemblierung in Form von Superkomplex c zur einer Steigerung der Aktivität um den Faktor 13,0 führt.

Die summierten relativen spezifischen Aktivitäten von Komplex IV sind in Abbildung 5.11 dargestellt. Hierbei zeigt BHM die höchste spezifische Aktivität. Im Vergleich dazu besitzt DHM eine um den Faktor 0,21 (stat. sig.), PHM eine um den Faktor 0,32 (stat. sig.) und WHM eine um den Faktor 0,13 (stat. n. sig.) niedrigere Aktivität.

Phillips *et al.*^[162] zeigten bei einem Vergleich der Aktivitäten von Komplex IV aus Herzmitochondrien von Schwein, Hase und Maus, dass bei Schwein die Aktivität am niedrigsten ist. Die Proben wurden mit dem im Gegensatz zu Digitonin "härteren" Detergens DDM solubilisiert, d.h. fragile Strukturen (z.B. Superkomplexe) wurden größtenteils zerstört^[163], und danach mittels BN-PAGE aufgetrennt. Es wurde ein ähnlicher Aktivitätstest wie in 4.8.2 beschrieben durchgeführt und für die Quantifizierung wurde ähnlich wie in 5.1.3.1 vorgegangen.

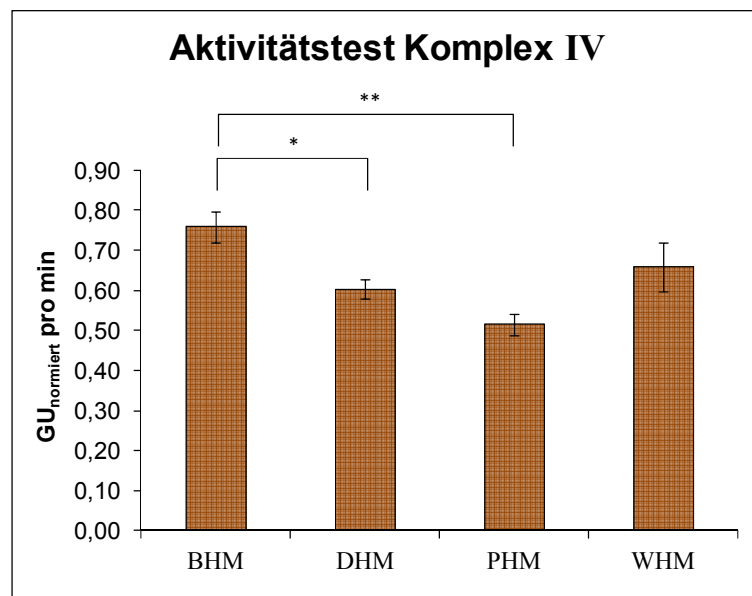


Abbildung 5.11: Gesamtsumme der relativen spezifischen Aktivitäten für Komplex IV von BHM, DHM, PHM und WHM. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der Summe der spezifischen Aktivitäten. Die Signifikanzniveaus sind identisch mit **Abbildung 5.8**. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM).

5.1.3.3 Herzmitochondrien aus Maus und Ratte (Wistar und Fischer)

Die Zuordnung der Proteinbanden für einen Komplex-IV-Aktivitätstest wurde bereits in Abschnitt 5.1.2.2 (Abbildung 5.2 C) dargestellt. Das Gelbild, das für die Auswertung herangezogen wurde, ist im Anhang Abbildung 8.2 B gezeigt. Es wurden pro Spur (jeweils 3 technische Replikate) 100 µg (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 4 g/g für MHM, und 3 g/g für R_FHM und R_WHM) auf ein großes BN-Gel gegeben. Die Bestimmung des optimalen Detergens/Protein-Verhältnisses für diese Proben wurde unter meiner Anleitung von den Masterstudenten Olga Ankudin^[89] und Victoria Petermann^[90] durchgeführt.

Um den Einfluss altersbedingter Veränderungen auf die mitochondriale Atmungskette zu untersuchen wird in unserer Arbeitsgruppe das Modellsystem Ratte verwendet. So beschäftigte sich Frenzel^[145] mit den Auswirkungen des Alterns auf das mitochondriale Proteom von Hirngewebe aus Wistarratten, Thilmany^[95] untersuchte das mitochondriale Proteom aus Herz, Hirn und Leber von Fischer-Ratten. Ebenso wurden ähnliche Untersuchungen von Kratochwil^[3] an den Hirngeweben Cerebellum, Hippocampus und Cerebrum von Fischer-Ratten durchgeführt. Daher werden die Daten von MHM und R_WHM mit R_FHM verglichen.

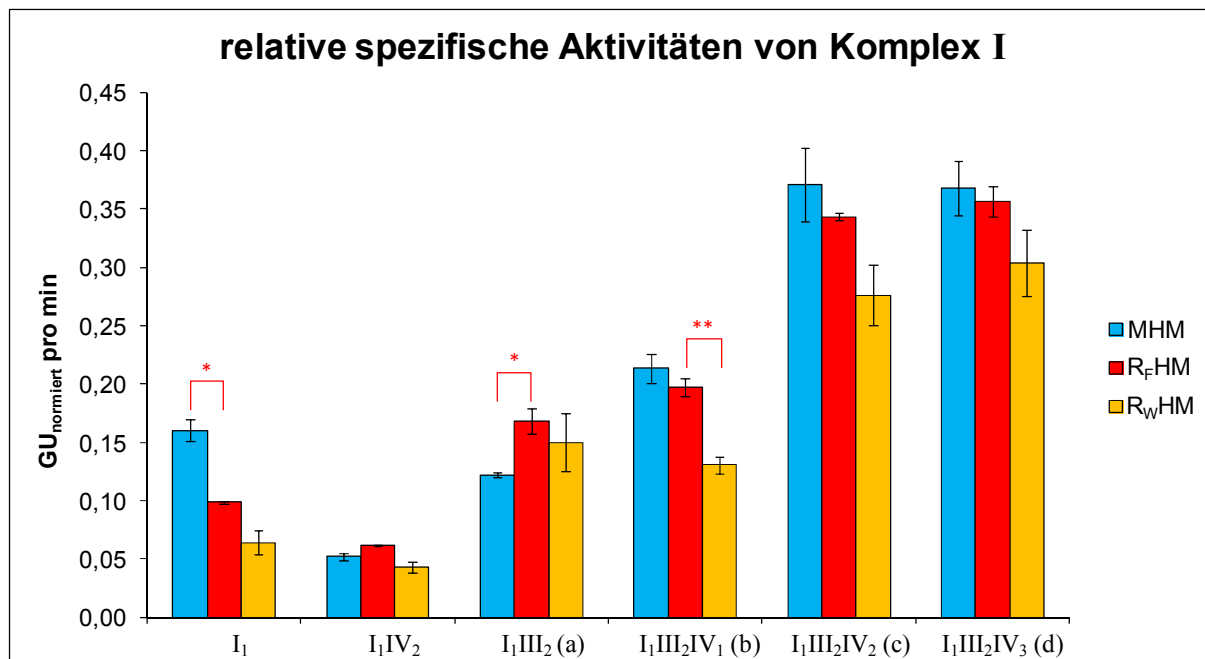


Abbildung 5.12: relative spezifische Aktivitäten von Komplex I für MHM, R_FHM (Fischer) und R_WHM (Wistar). Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang (Abbildung 8.2 B). Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der spezifischen Aktivitäten in normierten Graustufenwerten pro Minute (GU_{normiert} pro min). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt : * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Rote Sterne zeigen den Vergleich mit R_FHM (R_FHM vs MHM, R_FHM vs R_WHM).

Die relativen spezifischen Aktivitäten der Komplex I enthaltenden Assemblierungen von MHM, R_FHM (Fischer) und R_WHM (Wistar) sind in Abbildung 5.12 dargestellt. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Gewebe ist zu erkennen, dass die Superkomplexe c und d bei R_WHM eine niedrigere Aktivitäten (Faktor 0,20 bzw. 0,16, stat. n. sig.) aufweisen. Bei MHM ergeben sich unter Berücksichtigung des Standardfehlers ähnliche Aktivitäten wie bei R_FHM. Die größten Unterschiede treten bei dem individuellen Komplex I₁ auf. Während MHM im Vergleich zu R_FHM deutlich aktiver ist (Faktor 1,62, stat. sig.), zeigt R_WHM eine tendenziell verringerte Aktivität (Faktor 0,36, stat. n. sig.).

Bei der Verteilung der Aktivitäten von individuellem Komplex I₁, Superkomplex I₁IV₂ und den Superkomplexen a bis d ist ein ähnlicher Trend wie in Abschnitt 5.1.3.2 zu beobachten. Die Superkomplexe c und d zeigen die höchste Aktivität. Hier zeigt sich, dass je höher der Assemblierungsgrad in den Superkomplexen ist, desto aktiver ist Komplex I in dem zugehörigen Superkomplex. Bei R_FHM bzw. R_WHM äußert sich diese Zunahme in der Aktivität wie folgt: Superkomplex a um den Faktor 1,70 bzw. 2,34, Superkomplex b um den Faktor 1,99 bzw. 2,04, Superkomplex c um den Faktor 3,47 bzw. 4,31 und Superkomplex d um den Faktor 3,60 bzw. 4,75. Bei MHM ist für die Superkomplexe b, c und d ein ähnlicher Trend zu beobachten, allerdings zeigt Superkomplex a eine Abnahme der spezifischen Aktivität um den Faktor 0,24. Des Weiteren fällt auf, dass die Aktivität des Komplexes I₁IV₂ bei allen Proben eine geringere Aktivität aufweist als der individuelle Komplex I₁. Für MHM beträgt die Abnahme 67 %, für R_FHM 38 % und für R_WHM 33 %.

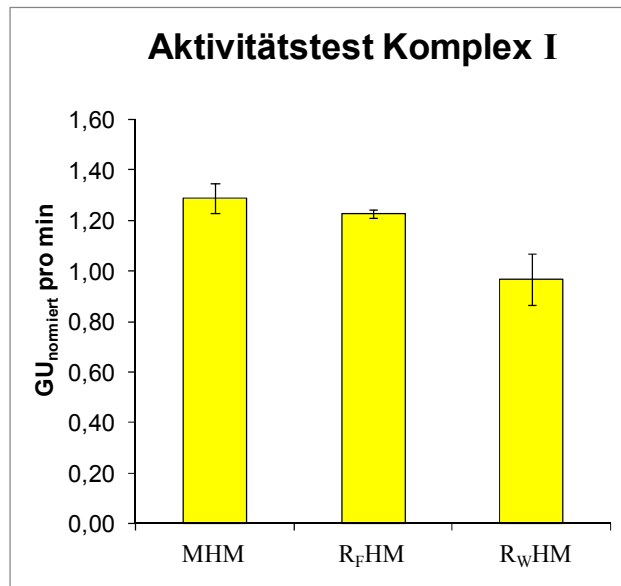


Abbildung 5.13: Gesamtsumme der relativen spezifischen Aktivitäten für Komplex I von MHM, R_FHM, R_WHM. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der Summe der spezifischen Aktivitäten.

Die Gesamtaktivität von Komplex I von den Proben ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Unter Berücksichtigung der Fehlerbalken ergeben sich für MHM und R_FHM ähnliche Aktivitäten. R_WHM ist vergleichsweise weniger aktiv (Faktor 0,79, stat. n. sig.), jedoch liegt die Aktivität mit 0,969 GU_{normiert} pro min in einem ähnlichen Bereich.

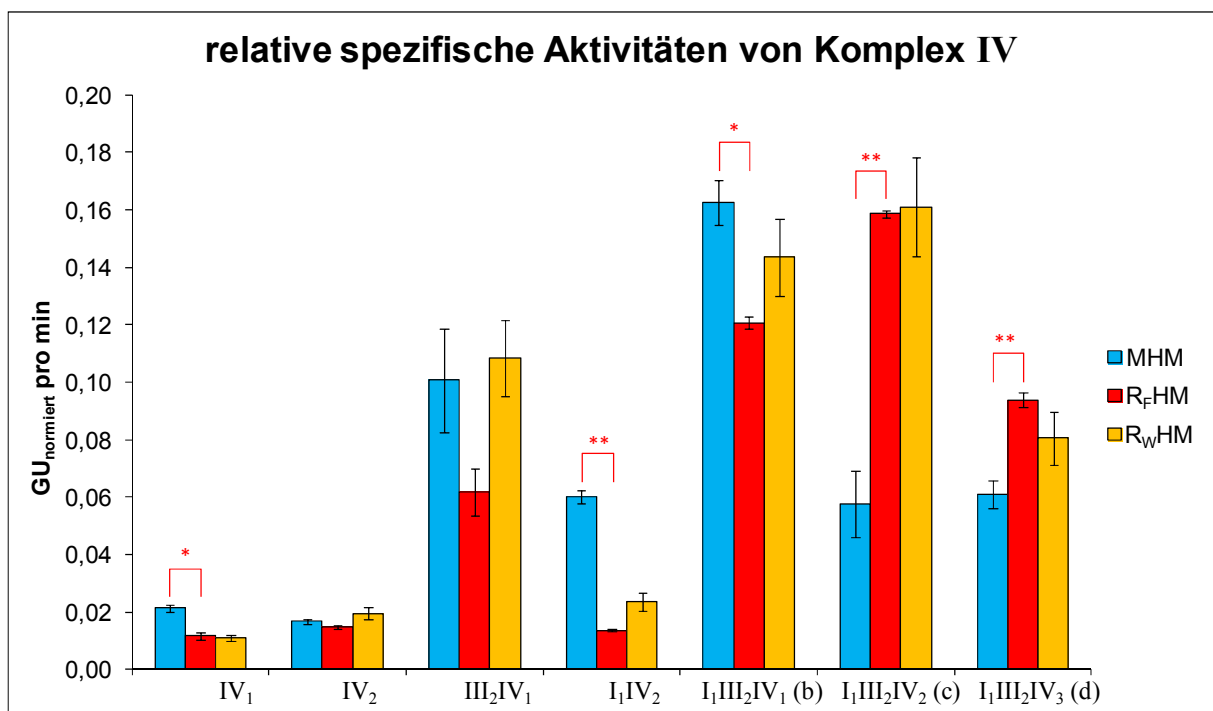


Abbildung 5.14: relative spezifische Aktivitäten für Komplex IV von MHM, R_FHM (Fischer) und R_WHM (Wistar). Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang (Abbildung 8.2 C). Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der spezifischen Aktivitäten in normierten Graustufenwerten pro Minute (GU_{normiert} pro min). Die Signifikanzniveaus sind identisch mit **Abbildung 5.12**. Rote Sterne zeigen den Vergleich mit R_FHM (R_FHM vs MHM, R_FHM vs R_WHM).

Eine qualitative Auswertung eines Aktivitätstests für Komplex IV von MHM, R_FHM und R_WHM ist in Abschnitt 5.1.2.2 (Abbildung 5.2 C) gezeigt. Auf ein großes BN-Gel wurden jeweils 3 technische Replikate (n = 3) von MHM, R_FHM und R_WHM (100 µg vor Solub., 4 g/g für MHM, 3 g/g für R_FHM und R_WHM) aufgetragen. Das zugehörige Gelbild ist im Anhang (Abbildung 8.2 C) gezeigt.

In Abbildung 5.14 sind die spezifischen Aktivitäten des individuellen Komplexes IV₁, des Dimers IV₂, des Komplexes III₂IV₁ und I₁IV₂ und der Superkomplexe b, c und d dargestellt. Im Gegensatz zu dem Komplex-I-Aktivitätstest im ersten Abschnitt sind hier bei den Komplex-IV-Aktivitäten der Superkomplexe deutliche Unterschiede zwischen MHM und R_FHM bzw. R_WHM zu erkennen. MHM besitzt im Vergleich zu R_FHM bei Superkomplex b eine um den Faktor 1,64 (stat. sig.) höhere, bei Superkomplex c eine um den Faktor 0,26 (stat. sig.) niedrigere und bei Superkomplex d eine um den Faktor 0,65 (stat. sig.) niedrigere Aktivität.

Ein Vergleich der Aktivitäten des individuellen Komplexes IV₁ mit den Superkomplexen zeigt eine deutliche Zunahme in den Aktivitäten. Wie bereits in Abschnitt 5.1.3.2 bei den Proben aus Rind, Reh, Schwein und Wildschwein zu sehen war, ist auch hier diese Steigerung der spezifischen Aktivität bei Komplex IV besonders stark ausgeprägt. Da die Unterschiede zwischen Maus und Ratte sehr deutlich sind, werden die Verhältnisse separat betrachtet. Für R_FHM und R_WHM ergeben sich dadurch im Vergleich zum individuellen Komplex IV₁ folgende Zunahmen der Aktivität (im Mittel): für I₁III₂IV₁ (b) um den Faktor 11,26, für I₁III₂IV₂ (c) um den Faktor 14,02 und für I₁III₂IV₃ (d) um den Faktor 7,63. Bei MHM zeigt sich für Superkomplex b (um den Faktor 7,37) die größte Zunahme der Aktivität und für Superkomplex c und d immerhin noch eine Steigerung um 2,68- bzw. 2,84-fache.

Betrachtet man unter diesem Aspekt auch Superkomplex III₂IV₁, so erhält man für MHM eine Zunahme der Aktivität um den Faktor 4,69, für R_FHM um den Faktor 5,27 und für R_WHM um den Faktor 9,79. Des Weiteren sind die größten Abweichungen bei Superkomplex I₁IV₂ zu erkennen. Hier steigt bei MHM die Aktivität auf das 2,81- und bei R_WHM auf das 2,13-fache deutlich an, während bei R_FHM nur ein geringer Anstieg um den Faktor 1,18 zu sehen ist.

Die Gesamtaktivität der Cytochrom-c-Oxidase für die Proben ist in Abbildung 5.15 gezeigt. MHM und R_FHM besitzen ähnliche Aktivitäten, während R_WHM tendenziell etwas aktiver ist (15 %, stat. n. sig.).

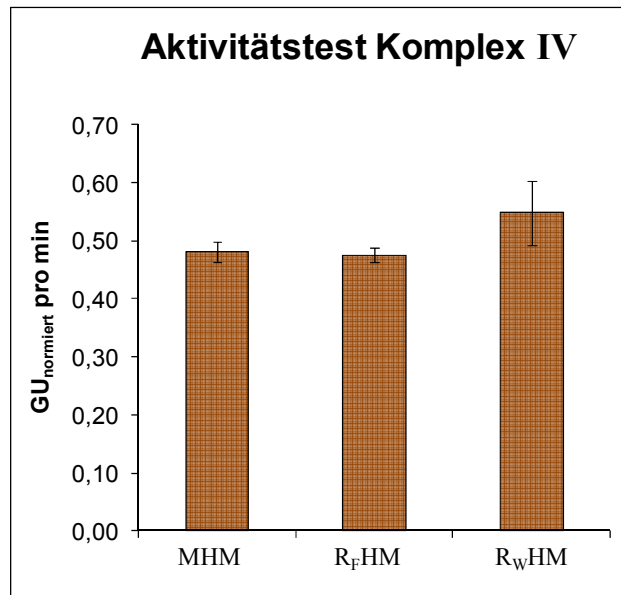


Abbildung 5.15: Gesamtsumme der relativen spezifischen Aktivitäten für Komplex IV von MHM, R_FHM, R_WHM. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der Summe der spezifischen Aktivitäten.

5.1.3.4 Mitochondrien aus Rehherz und Rehnier

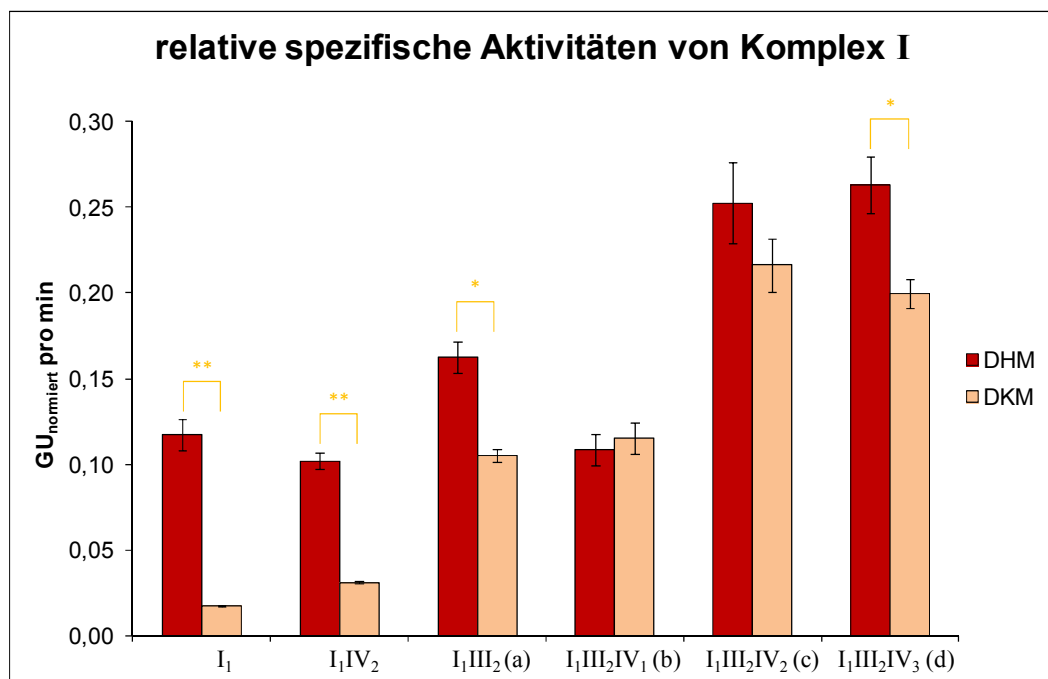


Abbildung 5.16: relative spezifische Aktivitäten für Komplex I von DHM und DKM. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang Abbildung 8.4 B. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der spezifischen Aktivitäten in normierten Graustufenwerten pro Minute (GU_{normiert} pro min). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt : * = p < 0,05; ** = p < 0,01. **Orangene Sterne** zeigen den Vergleich zwischen DHM und DKM.

Abbildung 5.16 stellt die relativen spezifischen Aktivitäten der Superkomplexe, des Komplexes I₁IV₂ und des individuellen Komplexes I₁ von DHM und DKM dar. Pro Spur wurden 100 µg (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von DHM und DKM auf

ein großes BN-Gel gegeben (Anhang Abbildung 8.4 B). Von jeder Probe wurden 3 technische Replikate hergestellt.

Es ist zu erkennen, dass der individuelle Komplex I₁ und der Superkomplex I₁IV₂ der NADH-Dehydrogenase aus Rehnere eine deutlich geringere Aktivität (Faktor 0,15 bzw. 0,31, beide stat. sig) im Vergleich zu DHM besitzen. Des Weiteren gibt es geringe spezifische Aktivitäten bei den Superkomplex für I₁III₂ (Faktor 0,65, stat. sig.) und für I₁III₂IV₃ (Faktor 0,68, stat. sig.) zu verzeichnen.

Bedingt durch die in Abbildung 5.16 dargestellte Verteilung der relativen spezifischen Aktivitäten ergeben sich für DHM und DKM deutlich unterschiedliche Ergebnisse bei dem Vergleich zwischen individuellem Komplex und den Superkomplexen. Für DHM sind die Werte ähnlich wie bereits in Abschnitt 5.1.3.2 beschrieben. Für DKM ist eine Zunahme der Aktivität mit steigendem Assemblierungsgrad des Superkomplexes (von a bis d) wie folgt zu sehen: Superkomplex a um das 6,09-, Superkomplex b um 6,66-, Superkomplex c um das 12,53- und Superkomplex d um das 11,56-fache. Im Vergleich zu DHM und auch zu den anderen untersuchten Proben stellt dies die bei weitem größte Aktivitätszunahme für Komplex I in den Superkomplexen dar.

Wie in Abbildung 5.17 zu erkennen, ist die gesamte spezifische Aktivität von DKM deutlich geringer als bei DHM (Faktor 0,68, stat. sig.). Ebenso zeigen Ergebnisse von Kwong *et al.*^[164], dass Komplex I aus Herzmitochondrien eine deutlich höhere Aktivität (über 170 %) im Vergleich zu Komplex I aus Nierenmitochondrien besitzt. Die Experimente wurden mit isolierten Mitochondrien aus Maus durchgeführt. Bei den Aktivitätstests wurden In-Lösung Aktivitätstests verwendet.

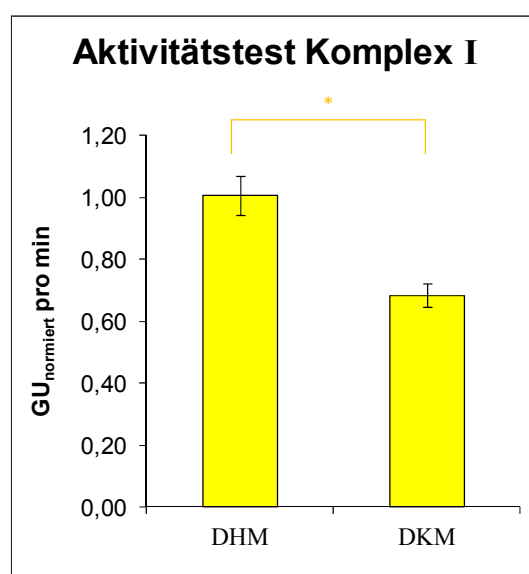


Abbildung 5.17: Gesamtsumme der relativen spezifischen Aktivitäten für Komplex I von DHM und DKM. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der Summe der spezifischen Aktivitäten. Die Signifikanzniveaus sind identisch mit **Abbildung 5.16**. **Orangene Sterne** zeigen den Vergleich zwischen DHM und DKM.

Im Folgenden werden die Ergebnisse eines quantitativen Komplex-IV-Aktivitätstests von DHM und DKM diskutiert. Eine qualitative Analyse der Proteinbanden dieses Tests wurde bereits in Abschnitt 5.1.2.3 (Abbildung 5.3 C) durchgeführt. Von allen Proben wurden technische Replikate ($n = 3$) hergestellt und es wurden jeweils 100 μg (vor Solub., 3 g/g) auf ein großes BN-Gel aufgetragen. Das für diese Auswertung verwendete Gel ist im Anhang (Abbildung 8.4 C) gezeigt.

In Abbildung 5.18 sind die relativen spezifischen Aktivitäten der Komplex IV enthaltenden Assemblierungen dargestellt. Während des Aktivitätstests (Abbildung 8.4 C) konnte beobachtet werden, dass die letzte Spur von DKM, die am äußeren Rand des BN-Gels lag, eine deutlich schwächere Intensität als die anderen Spuren aufweist. Diese Gelrandeffekte sind auch bei anderen Aktivitätstests zu sehen, allerdings wirkt es sich selten so stark auf das Ergebnis aus.

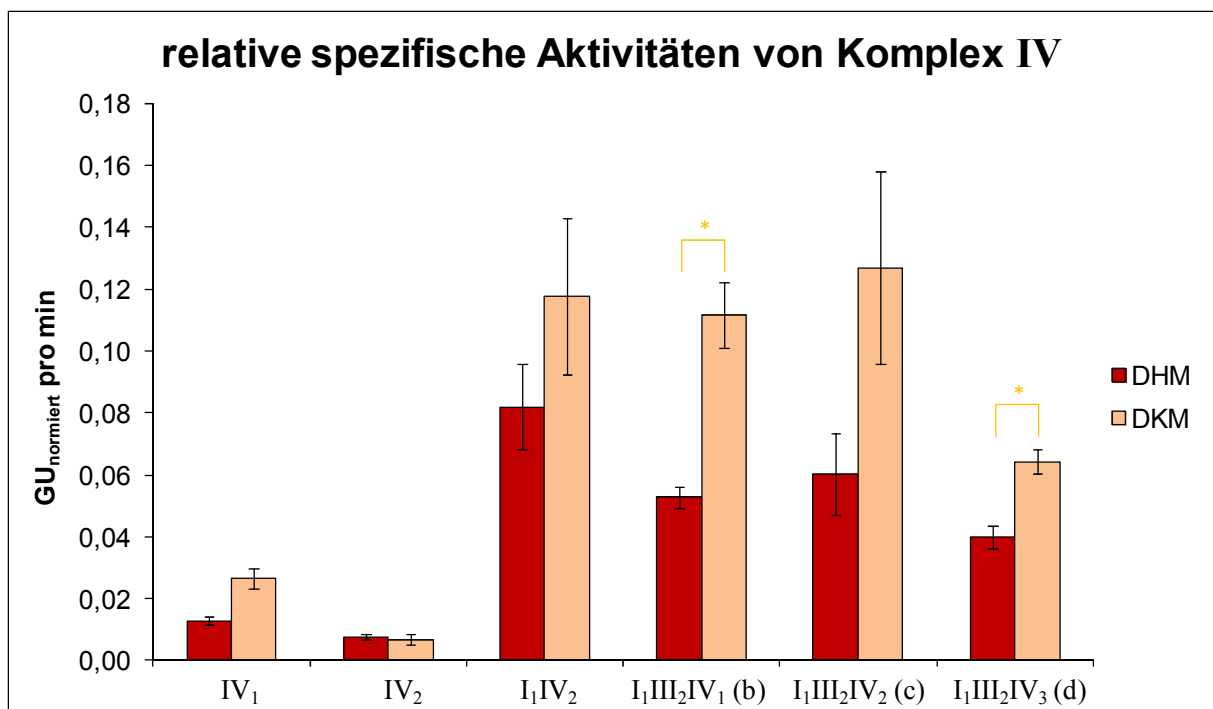


Abbildung 5.18: relative spezifische Aktivitäten für Komplex IV von DHM und DKM. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang Abbildung 8.4 C. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate ($n = 3$) der spezifischen Aktivitäten in normierten Graustufenwerten pro Minute ($\text{GU}_{\text{normiert}}$ pro min). Die Signifikanzniveaus sind identisch mit **Abbildung 5.16**. **Orangene Sterne** zeigen den Vergleich zwischen DHM und DKM.

Bei einem Vergleich der relativen spezifischen Aktivität des individuellen Komplexes IV₁ mit den anderen Komplexen (außer IV₂) ist eine deutliche Zunahme der Aktivität zu sehen. Dies stellt sich (im Mittel für DHM und DKM) wie folgt dar: bei Superkomplex I₁IV₂ eine Steigerung um den Faktor 5,39, bei Superkomplex b um den Faktor 4,15, bei Superkomplex c um den Faktor 4,72 und bei Superkomplex d um den Faktor 2,76.

Die summierten relativen spezifischen Aktivitäten sind in Abbildung 5.19 gezeigt. Komplex IV in DKM besitzt im Vergleich zu DHM eine um 44 % (stat. n. sig.) höhere Aktivität. Da sich in der Literatur keine Referenzen für Mitochondrien aus Rehgewebe finden lassen, werden andere Beispiele herangezogen.

Benard *et al.*^[165] untersuchten die Komplex-IV-Aktivitäten aus unterschiedlichen Geweben von männlichen Wistar-Ratten. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Cytochrom-*c*-Oxidase aus Herzmitochondrien eine 4,5 mal so hohe Aktivität besitzt wie aus Nierenmitochondrien. Diese Daten basieren auf Ergebnissen aus In-Lösung Aktivitätstests.

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Rustin *et al.*^[166] bei der Untersuchung von Mitochondrien aus menschlichem Gewebe. Es konnte für Komplex IV aus Herzgewebe eine 2- bis 3-fach höhere Aktivität als bei Nierengewebe ermittelt werden.

Im Gegensatz dazu fanden Xu *et al.*^[167] bei isolierten Mitochondrien aus Herz und Nierengewebe von Mäusen heraus, dass beide Gewebe eine ähnliche Aktivität besitzen.

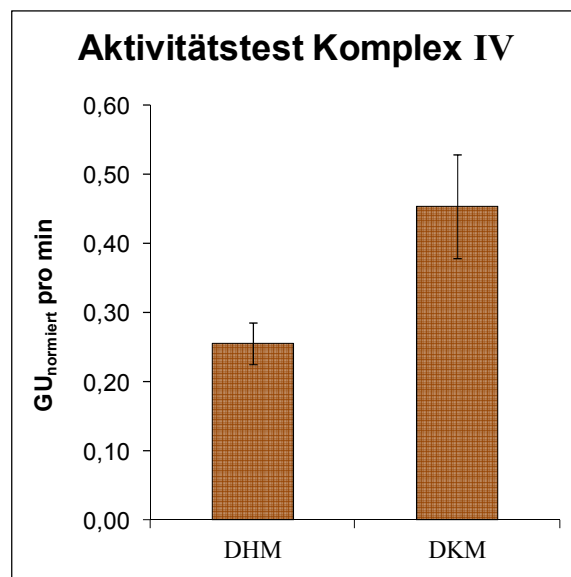


Abbildung 5.19: Gesamtsumme der relativen spezifischen Aktivitäten für Komplex IV von DHM, DKM. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der Summe der spezifischen Aktivitäten. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate.

5.1.3.5 Herzmitochondrien aus Rind (verschiedene Bezugsquellen)

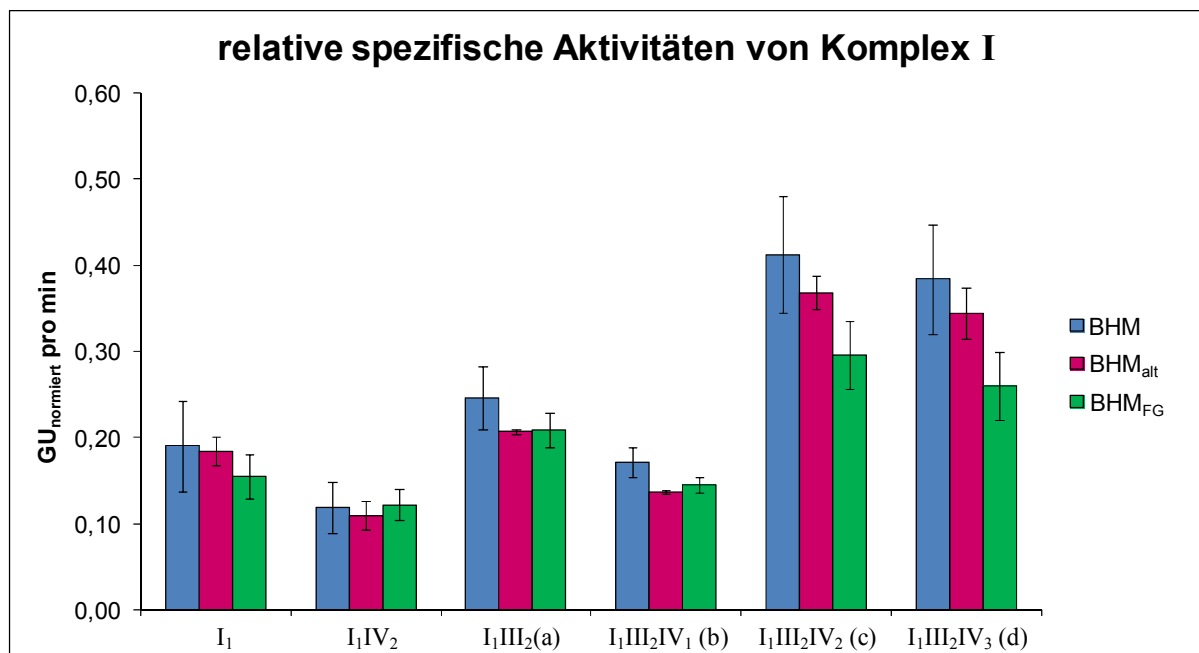


Abbildung 5.20: relative spezifische Aktivitäten von Komplex I für BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG}. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang Abbildung 8.3 B. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der spezifischen Aktivitäten in normierten Graustufenwerten pro Minute (GU_{normiert} pro min). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate.

Eine qualitative Auswertung eines Komplex-I-Aktivitätstests von BHM, BHM_{alt}, und BHM_{FG} wurde bereits in Abschnitt 5.1.2.4 (Abbildung 5.4 B) vorgenommen. Das Gelbild, welches für die quantitative Auswertung verwendet wurde, ist im Anhang (Abbildung 8.3 B) dargestellt. Auf ein großes BN-Gel wurden pro Spur 100 µg (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG} gegeben. Von allen Proben wurden technische Replikate (n=3) verwendet.

In Abbildung 5.20 sind die relativen spezifischen Aktivitäten des individuellen Komplexes I₁, des Komplexes I₁IV₂ und der Superkomplexe I₁III₂ (a), I₁III₂IV₁ (b), I₁III₂IV₂ (c) und I₁III₂IV₃ (d) dargestellt. Die großen Fehlerbalken bei BHM sind auf Gelrandeffekte zurückzuführen.

Betrachtet man getrennt die spezifischen Aktivitäten der Proben für jeden Komplex und Superkomplex untereinander, so ist zu erkennen, dass die Werte sehr ähnlich sind. Beispielsweise betragen für Superkomplex b die Änderungen zwischen BHM und BHM_{alt} bzw. BHM_{FG} nur 10 % (im Mittel, stat. n. sig.).

Bei einem Vergleich der relativen spezifischen Aktivitäten von individuellem Komplex I und den Superkomplexen ergeben sich im Mittel folgende Werte: bei dem Superkomplex a eine Zunahme um den Faktor 1,25, bei Superkomplex c um den Faktor 2,02 und bei Superkomplex d um den Faktor 1,85. Nur bei Superkomplex b ist eine Abnahme um 14,0 % zu sehen.

Dies bedeutet für BHM_{alt}, dass eine ordnungsgemäße Lagerung von Gewebe für mehrere Jahre bei -80 °C nur einen geringen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der

mitochondrialen NADH-Dehydrogenase hat. Das Ergebnis von BHM_{FG} muss allerdings differenzierter betrachtet werden. Bereits in Abschnitt 5.1.2.4 wurde diskutiert, dass im Vergleich zu BHM ein Degradation der ATP-Synthase, sowohl von Monomer als auch von Dimer, stattgefunden hat. Der Komplex I und höhere Assemblierungen scheinen nicht von diesen Abbauprozessen betroffen zu sein. Es fällt jedoch auf, dass Superkomplexen c und d eine etwas niedrigere Aktivität (stat. n. sig.) im Vergleich zu BHM aufweisen.

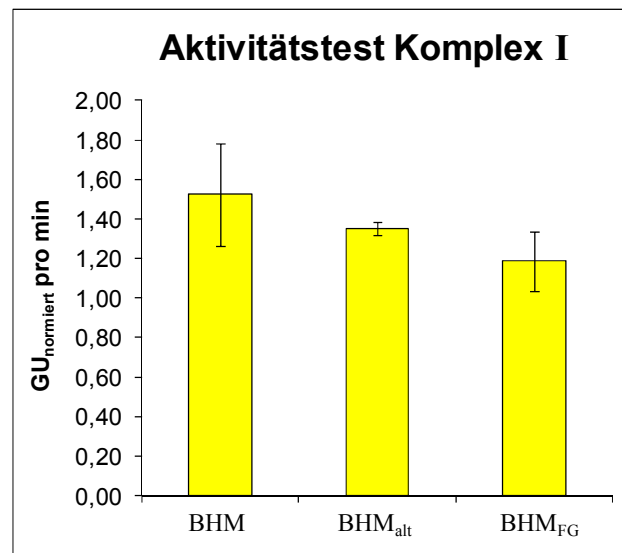


Abbildung 5.21: Gesamtsumme der relativen spezifischen Aktivitäten für Komplex I von BHM, BHM_{alt}, BHM_{FG}. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der Summe der spezifischen Aktivitäten.

Abbildung 5.21 fasst die Ergebnisse für die relativen spezifischen Aktivitäten der NADH-Dehydrogenase zusammen. Die höchste Aktivität zeigt BHM. Bei BHM_{alt} und BHM_{FG} sind die Aktivitäten tendenziell etwas niedriger (stat. n. sig.).

Die Auswertung des Komplex-IV-Aktivitätstests stützt sich auf die Zuordnung der Proteinbanden in Abschnitt 5.1.2.4 (Abbildung 5.4 C). Das BN-Gel des Aktivitätstests ist im Anhang (Abbildung 8.3 C) gezeigt. Von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG} wurden jeweils 3 technische Replikate auf ein großes BN-Gel aufgetragen.

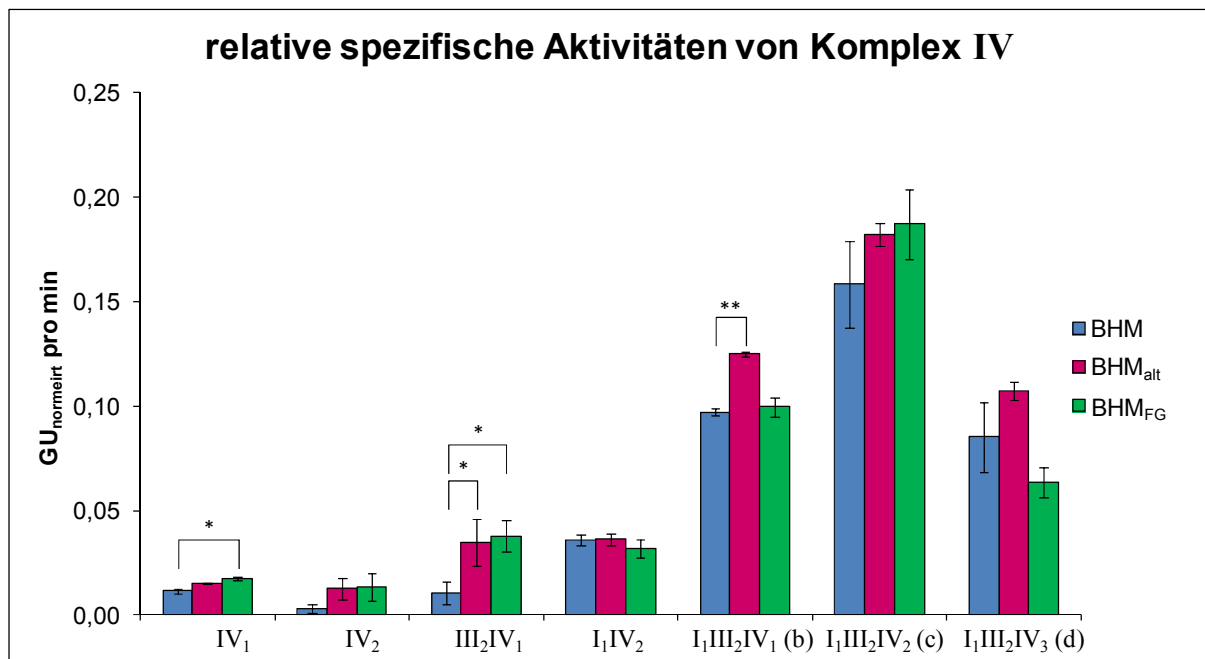


Abbildung 5.22: relative spezifische Aktivitäten für Komplex IV von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG}. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang (Abbildung 8.3 C). Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der spezifischen Aktivitäten in normierten Graustufenwerten pro Minute (GU_{normiert} pro min). Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt : * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs BHM_{alt}, BHM vs BHM_{FG})

Betrachtet man die relativen spezifischen Aktivitäten von Komplex IV (Abbildung 5.22), so fällt auf, dass die Superkomplexe I₁III₂IV₁ (b) und I₁III₂IV₂ (c) die höchsten Aktivitäten besitzen. Dieses Resultat stimmt mit den bereits in den Abschnitten 5.1.3.2 und 5.1.3.3 dargestellten Ergebnissen für die Cytochrom-c-Oxidase überein. Bei einem Vergleich zwischen BHM und BHM_{alt} bzw BHM_{FG} ist zu erkennen, dass für Superkomplex c keine statistisch signifikanten Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten auftreten. Bei Superkomplex b ist BHM_{alt} vergleichsweise am aktivsten (Faktor 1,29, stat. sig.).

Des Weiteren sind bei Komplex III₁IV₂ deutliche Abweichungen bei den spezifischen Aktivitäten zu sehen. BHM ist mit 0,01 GU_{normiert} pro min am wenigsten aktiv, während BHM_{alt} eine um den Faktor 3,26 (stat. sig.) und BHM_{FG} sogar eine um den Faktor 3,56 höhere Aktivität aufweist. Bei dem Superkomplex I₁IV₂ und dem Dimer IV₂ sind dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede zu sehen.

Auch hier bestätigt ein Vergleich der Aktivitäten zwischen individuellem Komplex IV₁ und den Superkomplexen b, c und d den bereits erwähnten Trend einer deutlichen Zunahme der Aktivität bei den Superkomplexen. Dementsprechend ist bei Superkomplex b eine Steigerung der Aktivität auf 7,39-, bei Superkomplex c auf das 12,05- und bei Superkomplex d auf 5,99-fache zu erkennen. Bei diesen Werten handelt es sich um das statistische Mittel aus BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG}.

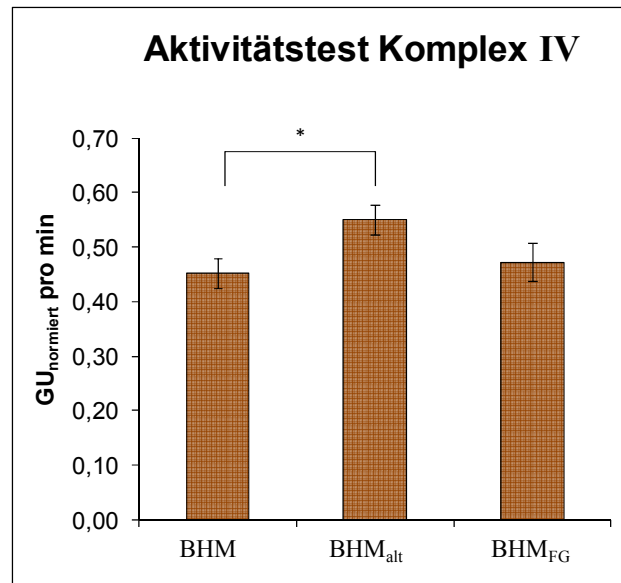


Abbildung 5.23: Gesamtsumme der relativen spezifischen Aktivitäten für Komplex IV von BHM, BHM_{alt}, BHM_{FG}. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate ($n = 3$) der Summe der spezifischen Aktivitäten. Die Signifikanzniveaus sind identisch mit **Abbildung 5.22**. Der schwarze Sterne zeigt den Vergleich mit BHM.

Die Gesamtaktivität der Cytochrom-c-Oxidase von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG} ist in Abbildung 5.23 dargestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für den Komplex I-Aktivitätstest ergibt sich hier eine andere Verteilung der Gesamtaktivitäten. Während BHM und BHM_{FG} relativ ähnliche Aktivitäten besitzen, zeigt BHM_{alt} eine signifikant höhere Aktivität (Faktor 1,22).

5.1.3.6 Zusammenfassung

Für die quantitative Analyse der In-Gel Aktivitätstests der Komplexe I und IV wurden Mitochondrien aus Herzgewebe von Rind (verschiedene Bezugsquellen), Schwein, Wildschwein, Reh, Maus, Ratte (Wistar und Fischer) und Nierengewebe von Reh verwendet. Bei allen untersuchten Proben zeigten für Komplex I die Superkomplexe I₁III₂IV₂ (c) und I₁III₂IV₂ (d) die höchste spezifische Aktivität. Bei den Komplex IV-Aktivitätstests besaßen die Superkomplexe I₁III₂IV₁ (b) und I₁III₂IV₂ (c) von BHM, DHM, PHM, WHM und RHM die höchste spezifische Aktivität. Bei MHM traf dies nur auf Superkomplex b zu, bei DKM auf die Superkomplexe I₁IV₂, b und c.

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der individuellen Komplexes (I₁ bzw. IV₁) und der Superkomplexe ist in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Es handelt sich hierbei um die Steigerungen der Aktivität normiert auf den jeweiligen individuellen Komplex der unterschiedlichen Säugetierproben. Für Komplex I ist zu erkennen, dass die Superkomplexe c und d im Vergleich zu den anderen Superkomplexen aktiver sind. Warum gerade bei den Mitochondrien aus Rehnierengewebe diese Zunahme so stark ausgeprägt sind, kann an dieser Stelle nicht ausreichend geklärt werden. Da es sich bei den untersuchten Proben von Rind-, Schwein-, Wildschwein-, Rehherz und Rehnier jeweils nur um ein biologisches Replikat ($n = 1$) handelt, müssten weitere Experimente mit einer größeren Anzahl an Replikaten

durchgeführt werden. Bei den Superkomplexen a und b ist dieser Effekt schwächer. Bei BHM und DHM für Superkomplex b und bei MHM für Superkomplex a zeigen sich sogar niedrigere Aktivitäten. Der Superkomplex I₁IV₂ ist im Vergleich zu I₁ weniger aktiv.

Für Komplex IV ist bei allen Superkomplexen eine deutliche Zunahme der spezifischen Aktivität zu beobachten. Bei DKM konnte die Bande für den Superkomplex III₂IV₁ nicht eindeutig zugeordnet werden, dementsprechend wurde kein Wert ermittelt. Wie bereits erwähnt, zeigen die Superkomplexe b und c bei allen Proben außer bei MHM und DKM die größte Steigerung der Aktivität.

Ähnliche Resultate wurden auch von Kratochwil^[3] bei den OxPhos-Komplexen von Rattenhirnmitochondrien gefunden. Die Superkomplexe, welche aus den Komplexen I, III und IV zusammengesetzt waren, zeigten eine deutliche Steigerung der spezifischen Aktivität, während der Superkomplex I₁IV₂ im Vergleich zu dem individuellen Komplex (I₁ bzw. IV₁) weniger aktiv war. Auch die Untersuchungen von Muschol^[160] an dem filamentösen Pilz *Podospora anserina* haben gezeigt, dass die Superkomplexe b und c deutlich aktiver sind. Aus der Assemblierung dieser Komplexe zu den Superkomplexen würden sich auch noch andere Vorteile ergeben: Die Elektronentransporter Cytochrom *c* und Ubichinon müssten kürzere Wegstrecken zwischen den reaktiven Zentren zurücklegen^[23]. Die Komplexe III₂ und IV₁ stabilisieren den Komplex I₁^[168, 169]. Die Menge an gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist bei den Superkomplexen niedriger^[23, 170, 171]. Es könnte sich bei der Assemblierung der individuellen Komplexe zu Superkomplexen somit um ein konserviertes Strukturmotiv handeln, dass in den Mitochondrien der bisher untersuchten Säugetiere zu finden ist.

Tabelle 5.2: Vergleich der relativen spezifischen Aktivitäten des individuellen Komplexes I₁ bzw. IV₁ mit den Superkomplexen III₂IV₁, I₁IV₂, I₁III₂ (a), I₁III₂IV₁ (b), I₁III₂IV₂ (c), I₁III₂IV₃ (d). Gezeigt sind die Änderungen der spezifischen Aktivität normiert auf den jeweiligen individuellen Komplex I₁ bzw. IV₁ für die Proben BHM, DHM, PHM, WHM, MHM, R_FHM, R_WHM, DKM, BHM_{alt} und BHM_{FG}.

Komplex I	I ₁ IV ₂	I ₁ III ₂ (a)	I ₁ III ₂ IV ₁ (b)	I ₁ III ₂ IV ₂ (c)	I ₁ III ₂ IV ₃ (d)
BHM	0,69	1,23	0,91	2,26	2,49
DHM	0,72	1,24	0,89	2,68	2,71
PHM	1,03	1,89	1,20	2,12	1,74
WHM	0,65	1,50	1,00	2,12	2,16
MHM	0,33	0,76	1,33	2,32	2,29
R _F HM	0,62	1,70	1,99	3,47	3,60
R _W HM	0,67	2,34	2,04	4,31	4,75
DKM	1,81	6,10	6,66	12,53	11,56
BHM _{alt}	0,60	1,12	0,74	1,99	1,86
BHM _{FG}	0,79	1,35	0,94	1,91	1,68

Komplex IV	III ₂ IV ₁	I ₁ IV ₂	I ₁ III ₂ IV ₁ (b)	I ₁ III ₂ IV ₂ (c)	I ₁ III ₂ IV ₃ (d)
BHM	4,04	4,28	9,16	8,17	3,42
DHM	6,27	4,17	9,82	8,49	3,93
PHM	2,99	2,70	8,02	7,11	3,41
WHM	2,50	1,64	6,99	8,06	5,51
MHM	4,69	2,81	7,58	2,68	2,84
R _F HM	5,27	1,18	10,29	13,51	8,00
R _W HM	9,79	2,13	12,95	14,53	7,27
DKM		4,05	4,22	4,79	2,43
BHM _{alt}	2,25	2,36	8,09	11,79	6,96
BHM _{FG}	2,16	1,82	5,69	10,69	3,64

5.1.4 Identifizierung von Proteinen in 2-D BN/SDS-Gelen

Für die Identifizierung von Proteinen in 2-D BN/SDS-Gelen wurden jeweils 140 µg Protein (vor Solub.) von DHM, PHM, WHM, DKM (Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) und MHM (4 g/g) eingesetzt. Als Proteinmassenstandard wurde in der 2. Dimension jeweils 4 µL des LMW-Markers auf das Gel gegeben. Nachdem das Gel mit Silber gefärbt worden ist, wurden die Proteinspots mit einer Hautstanze (Ø 2,0 mm) herausgeschnitten und entfärbt (Abschnitt 4.10, ausführliche Probenpräparation in Kratochwil^[3]). Die weitere Probenvorbereitung und der tryptische Verdau wurden am Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ) in Düsseldorf durchgeführt. Die Identifizierung der Spots erfolgte mit einem MALDI-TOF/TOF MS Ultraflex I (in Zusammenarbeit mit meiner Kollegin Dr. Manuela Kratochwil) unter Anleitung von Dr. Stefan Lehr und Dr. Sonja Hartwig.

Im Folgenden werden die aus diesen Messungen erhaltenen Daten dargestellt. Für eine bessere Zuordnung der identifizierten Untereinheiten zu den entsprechenden Komplexen und Superkomplexen wird ein Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen horizontal über das Silber gefärbte 2-D Gel gelegt. Des Weiteren sind die Proteinspots in verschiedenen Farben wie folgt eingeteilt:

Identifizierte Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase (**Komplex I**) sind in **Gelb**, der Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (**Komplex III**) in **Grün**, der Cytochrom-*c*-Oxidase (**Komplex IV**) in **Orange**, der ATP-Synthase (**Komplex V**) in **Blau** dargestellt. Proteine des **Citratzyklus** sind in **Lila**, **Hitzeschockproteine** in **dunkelgrün**, Proteine der **β-Oxidation von Fettsäuren** in **Rot** und **Transportproteine** in **Türkis** gezeigt. Schwarz markierte Proteinspots wurden entweder bei einem der anderen Organismen identifiziert oder beziehen sich auf die PMF-Analyse von BHM nach Kratochwil^[3] und Hunzinger *et al.*^[4]. Proteinspots, die in Grau dargestellt sind, wurden mittels 2-D Western Blots (Abschnitt 5.1.4.1) zugeordnet. Diese

Western Blots wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] durchgeführt.

Die Mascot Datenbank wurde für die Identifizierung der Peptide verwendet. Die entsprechenden Suchparameter sind in Abschnitt 4.10.1 zu finden. Für die Proben aus Mäuseherz wurde die Taxonomie *Mus musculus* (Maus) verwendet. Für ein signifikantes Ergebnis (MS-Messung) muss der aus den Messdaten ermittelte Mascot Score größer als 55 ($p < 0,05$) sein. Da für die anderen Proben die Datenbankeinträge nur sehr begrenzt bzw. nicht vorhanden sind, wird für die Taxonomie allgemein nach *Mammalia* (Säugetiere) gesucht. Hierbei ist ein Ergebnis nur dann signifikant, wenn der Mascot Score größer als 61 ($p < 0,05$) ist. Die Daten aus den MS/MS-Messungen werden unabhängig von ihrem Score dargestellt.

In den folgenden Tabellen bezeichnet die Abkürzung ID die Spotnummer des identifizierten Peptids auf dem 2-D BN/SDS-Gel. Die Abkürzung P steht für die Anzahl der Peptide und SC für die Übereinstimmung der Peptidsequenz mit der in Mascot hinterlegten Daten in %. Bei dem Begriff "Accession" handelt es sich um die Abkürzungen der identifizierten Untereinheiten entsprechend der UniProt Datenbank. Es wird auch angegeben, mit welchem Organismus die gefundene Peptidsequenz übereinstimmt. Die meisten Ergebnisse stammen aus der Datenbank für Maus (MOUSE), Ratte (RAT), Mensch (HUMAN), Goldhamster (MESAU, *Mesocricetus auratus*) und Rind (BOVIN). Des Weiteren werden für identifizierte Peptidsequenzen auch häufig Übereinstimmungen mit Proteinen von Primaten gefunden. Die entsprechenden Abkürzungen lauten wie folgt: Gorilla (GORGO, *Gorilla gorilla gorilla*), Sumatra- und Borneo-Orang-Utan (PONAB, *Pongo pygmaeus abelii*, und PONPY, *Pongo pygmaeus*), Javaneraffe (MACFA, *Macaca fascicularis*), Schimpanse (PANTR, *Pan troglodytes*) und Philippinen-Koboldmaki (TARSY, *Tarsius syrichta*).

In den Abbildungen 5.24 bis 5.28 sind die 2-D BN/SDS-Gele von DHM, MHM, PHM, WHM und DKM inklusive identifizierter Proteinspots dargestellt.

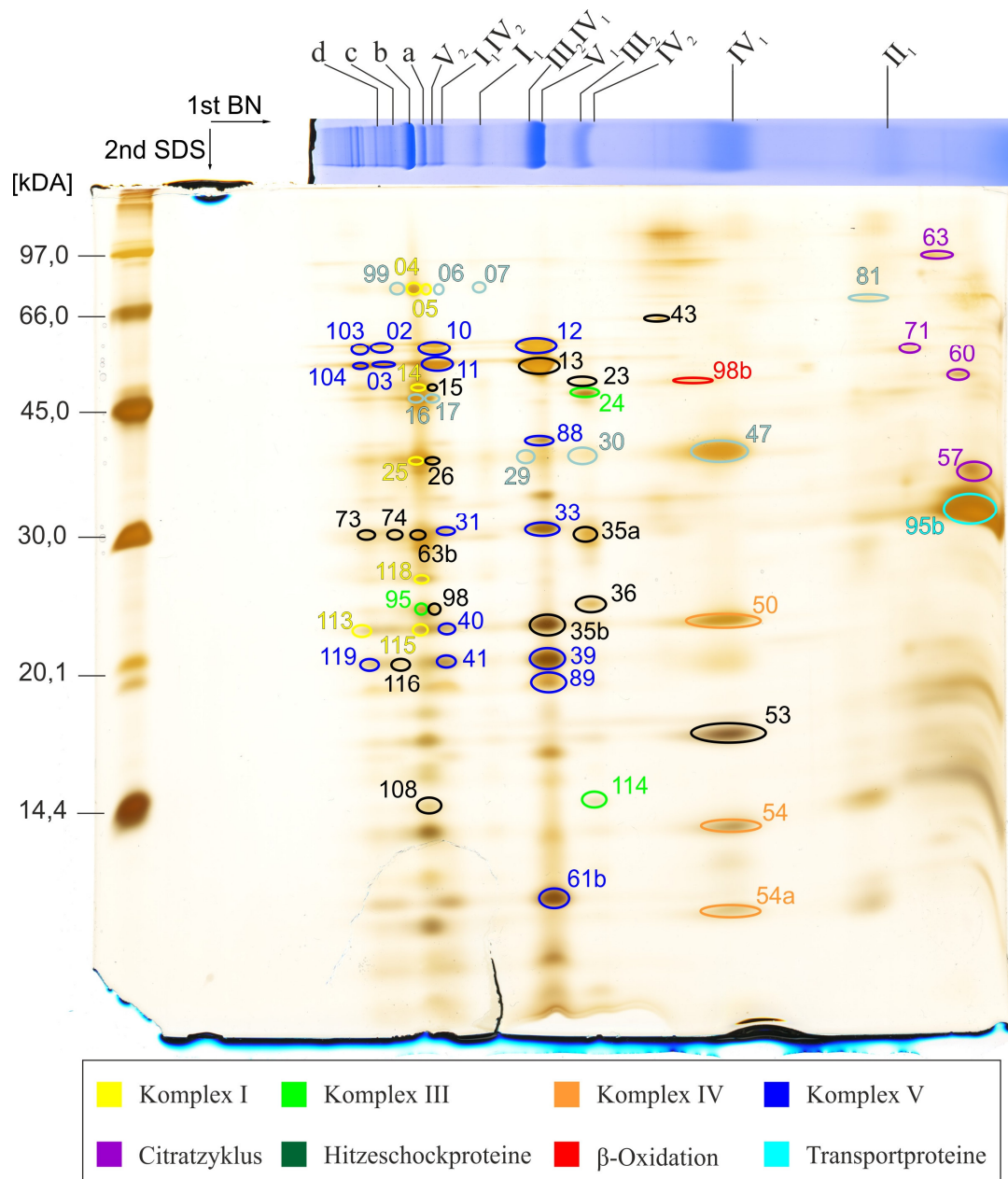


Abbildung 5.24: 2-D BN/SDS-Gel von DHM für PMF-Analyse. Es wurden 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 3 g/g) von DHM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Nach beendeter Elektrophorese wurde mit Silber gefärbt (Abschnitt 4.7.2). Die Färbung des Gels und das Ausschneiden der Proteinspots wurde an der TU Darmstadt durchgeführt, die Identifizierung der Spots im DDZ in Düsseldorf unter Anleitung von Dr. Stefan Lehr und Dr. Sonja Hartwig. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links). Identifizierte Proteinspots sind entsprechend der Einteilung unterhalb des Gels farbig dargestellt. Schwarz markierte Proteinspots basieren auf identifizierten Spots aus den anderen Organismen (MHM, PHM, WHM, DKM) oder von BHM nach Kratochwil^[3] und Hunzinger *et al.*^[4]. Graue Proteinspots wurden mit 2-D Western Blots (Abschnitt 5.1.4.1) nachgewiesen. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃. Für DHM konnten insgesamt 35 Proteine identifiziert werden.

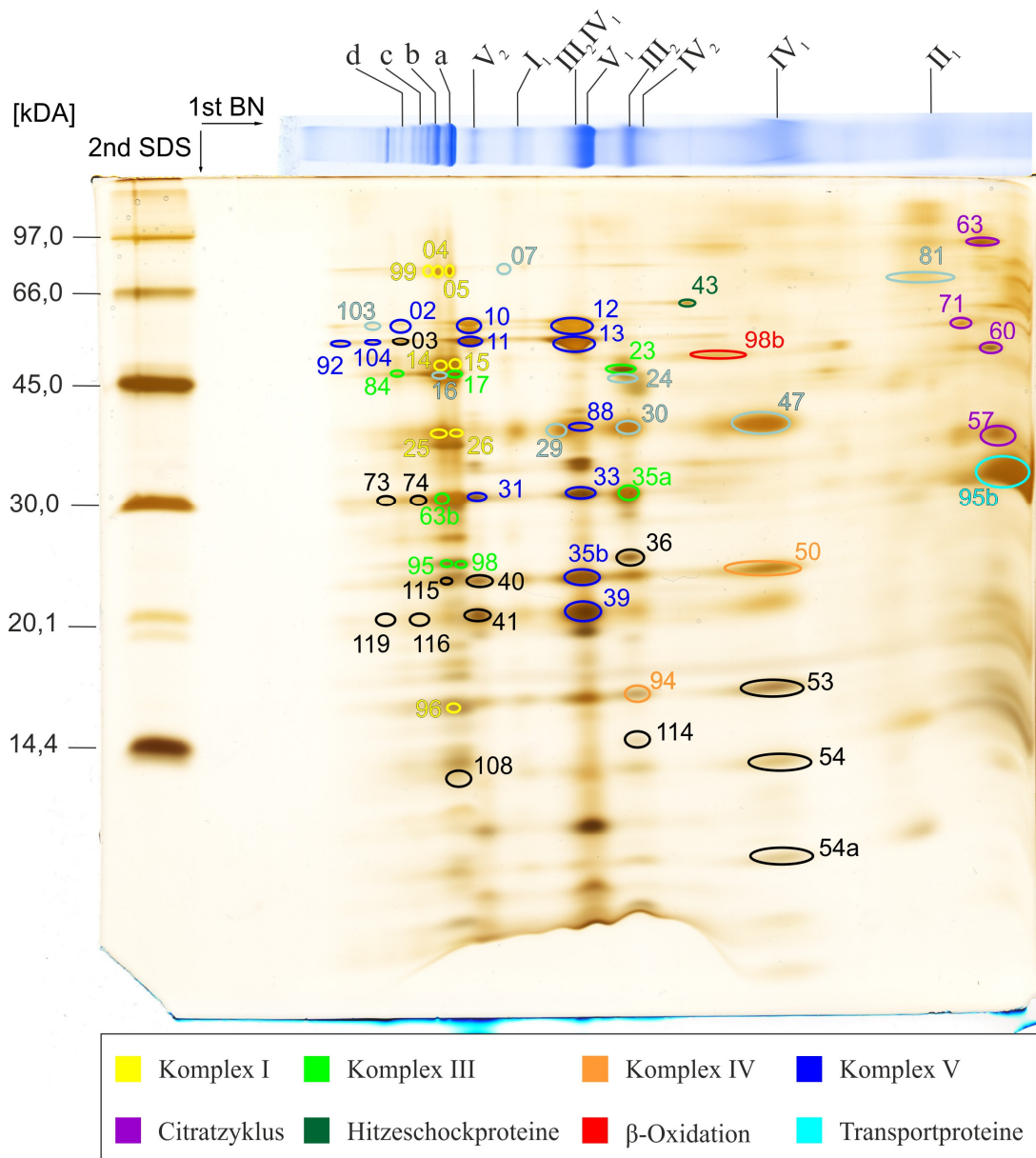


Abbildung 5.25: 2-D BN/SDS-Gel von MHM für PMF-Analyse. Es wurden 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 4 g/g) von MHM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Die weitere Präparation erfolgte wie in **Abbildung 5.24** bereits beschrieben. Für MHM konnten insgesamt 36 Proteine identifiziert werden.

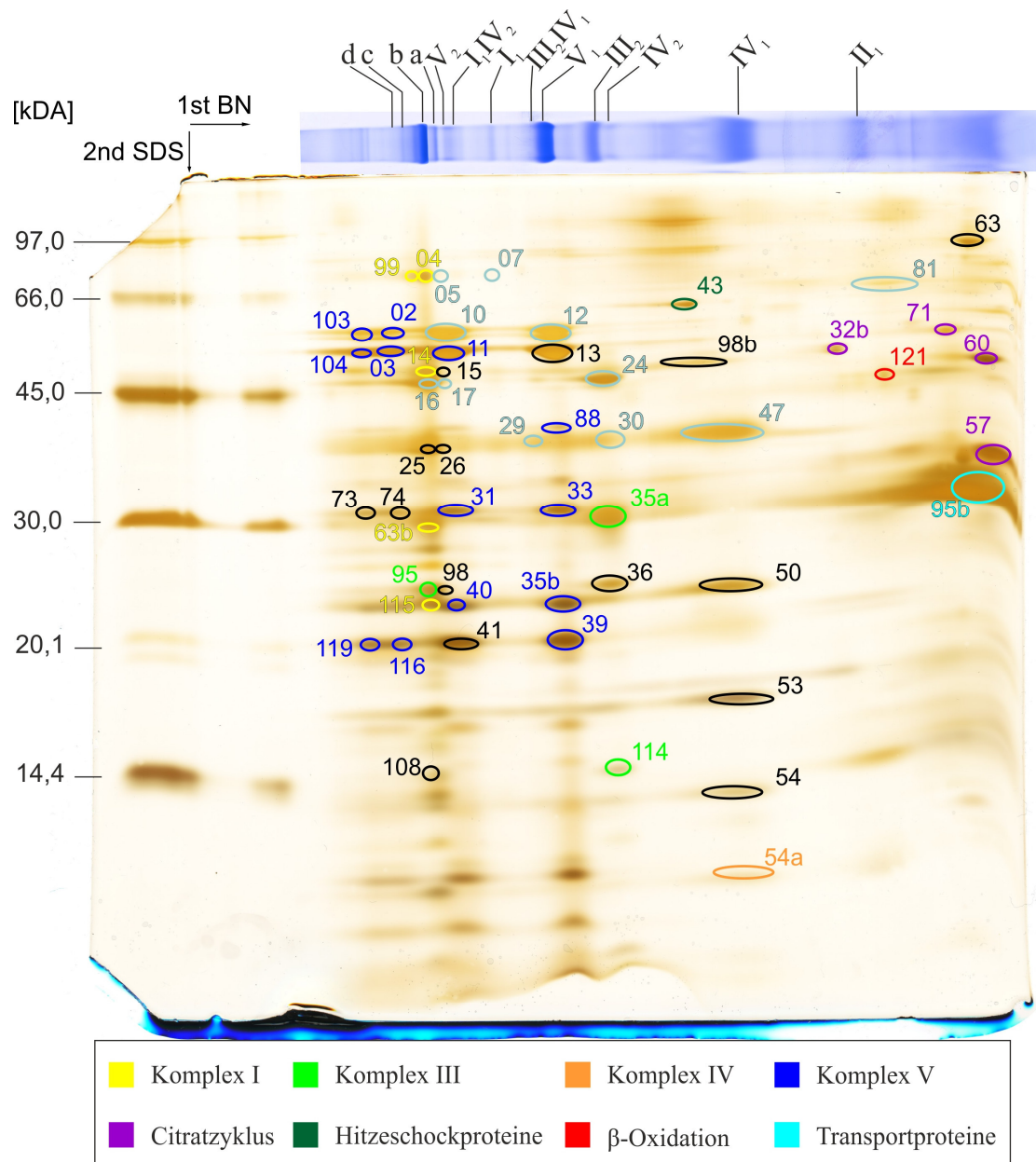


Abbildung 5.26: 2-D BN/SDS-Gel von PHM für PMF-Analyse. Es wurden 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 3 g/g) von PHM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Die weitere Präparation erfolgte wie in **Abbildung 5.24** bereits beschrieben. Für PHM konnten insgesamt 30 Proteine identifiziert werden.

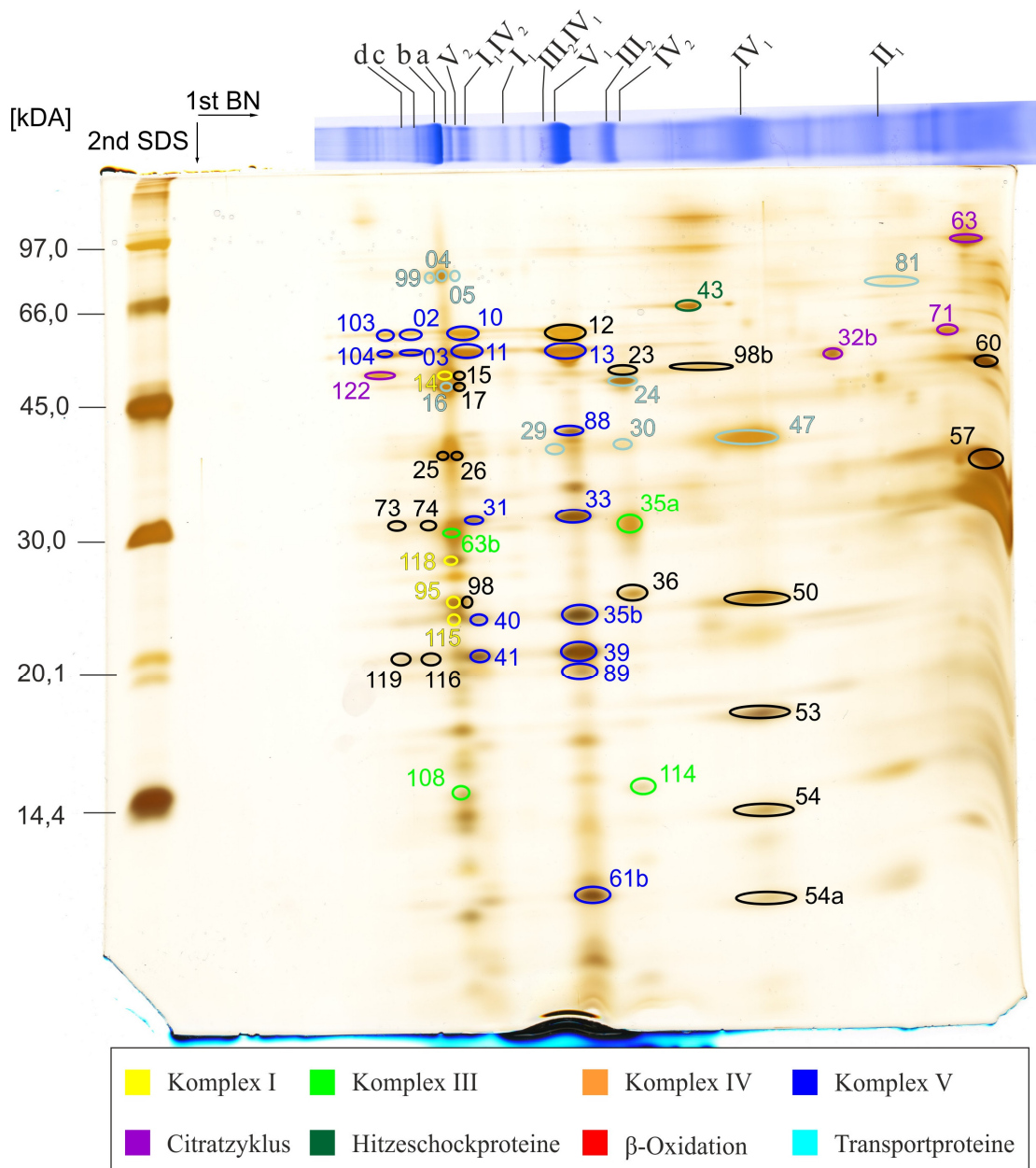


Abbildung 5.27: 2-D BN/SDS-Gel von WHM für PMF-Analyse. Es wurden 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 3 g/g) von WHM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Die weitere Präparation erfolgte wie in **Abbildung 5.24** bereits beschrieben. Für WHM konnten insgesamt 29 Proteine identifiziert werden.

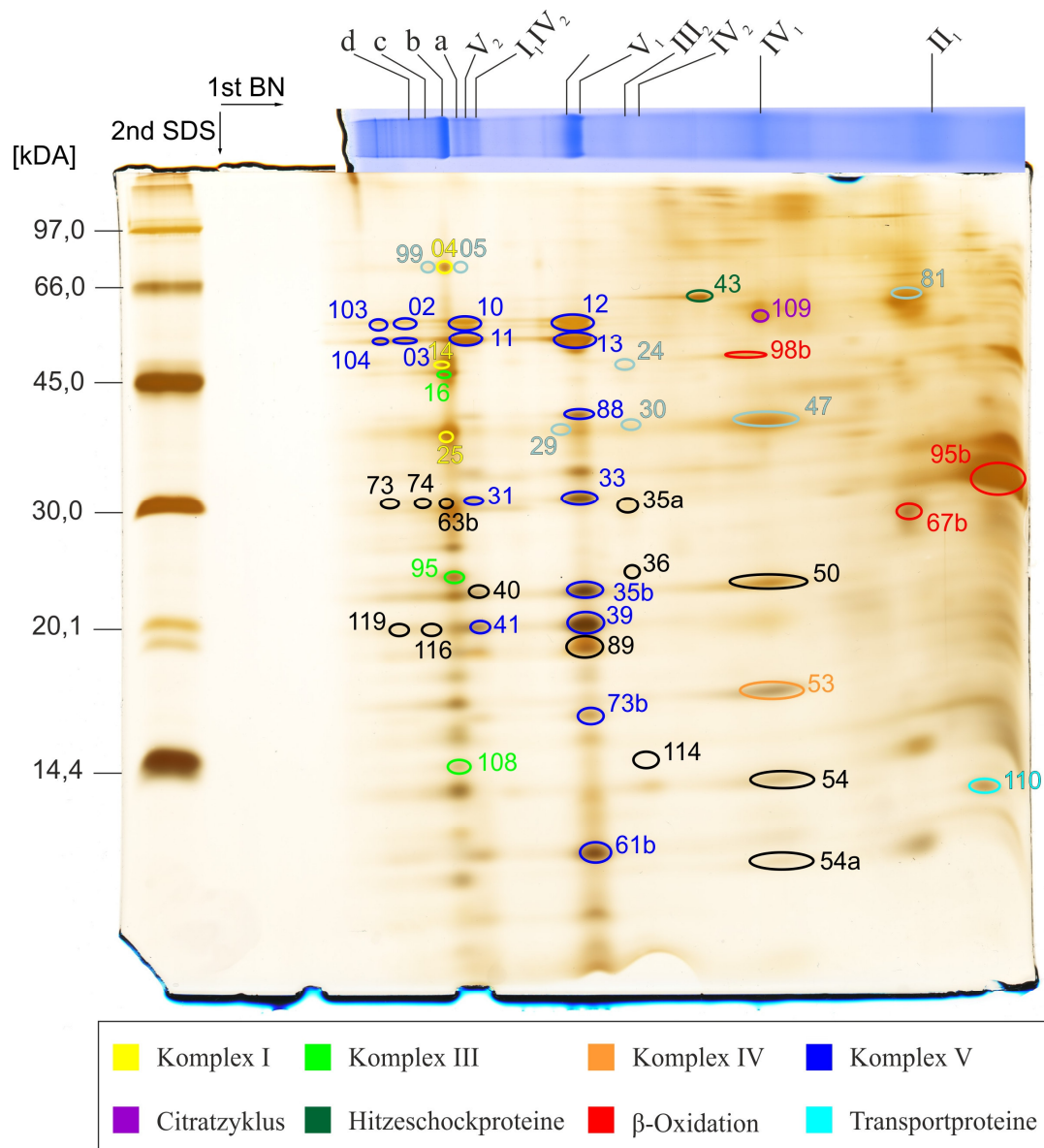


Abbildung 5.28: 2-D BN/SDS-Gel von DKM für PMF-Analyse. Es wurden 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 3 g/g) von DKM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Die weitere Präparation erfolgte wie in **Abbildung 5.24** bereits beschrieben. Für DKM konnten insgesamt 30 Proteine identifiziert werden.

Die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) ist das erste und mit ca. 14 bzw. 45 Untereinheiten (für Bakterien bzw. Säugetiere)^[172] auch das größte Enzym der mitochondrialen Atmungskette. Hierbei handelt es sich um ein hochgradig konserviertes Struktur- und Funktionsmotiv, dass in vielen Organismen zu finden ist. Den Untereinheiten können folgende Funktion zugeordnet werden^[172-176]: NDUS1, NDUV1 und NDUV2 sind Teil der katalytischen Triade der Dehydrogenase. NDUS2, NDUS3, NDUS7, NDUF8, ND1 und ND5 sind Teil der Hydrogenase-Einheit von Komplex I. Die Untereinheiten NDUA9 und NDUB9 sind Teil der hydrophoben Transmembrandomäne (Uniprot Datenbank).

Gomez *et al.*^[177] haben in den Superkomplexen I₁III₂ (a), I₁III₂IV₁ (b), I₁III₂IV₂ (c) und I₁III₂IV₃ (d) jeweils die Untereinheiten NDUS1, NDUV2 und NDUA9 nachgewiesen. Nach einer BN-PAGE mit solubilisierten interfibrillaren Rattenherzmitochondrien wurden die Superkomplexe aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem LC-MALDI-MS/MS untersucht.

In den Tabelle 5.3 und 5.4 sind die identifizierten Untereinheiten von Komplex I aufgelistet. Für DHM können insgesamt sieben Proteinspots (fünf verschiedene Untereinheiten), für MHM acht Proteinspots (vier Untereinheiten), für PHM fünf Proteinspots (vier Untereinheiten), für WHM vier Proteinspots (drei Untereinheiten) und für DKM drei Proteinspots (drei Untereinheiten) identifiziert werden. Besonders die 75 kDa Untereinheit (NDUS1) kann bei allen Proben am häufigsten nachgewiesen werden. Dieses Protein kann den Superkomplexen a, b und c (Spotnr. 04, 05 und 99) zugeordnet werden.

Tabelle 5.3: Identifizierte Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase (Komplex I)

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
04	DHM	MS	NDUS1_HUMAN	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	79,4	101,0	14	21,6
	DHM	MS	NDUS1_GORGO		79,4	101,0	13	19,5
	DHM	MS/MS	NDUS1_GORGO		79,4	193,9	2	5,4
	DKM	MS	NDUS1_GORGO		79,4	88,9	14	26,1
	DKM	MS	NDUS1_MACFA		79,5	81,2	13	25,2
	DKM	MS/MS	NDUS1_MESAU		79,4	68,1	2	11,1
	MHM	MS	NDUS1_MOUSE		79,7	154,0	19	26,8
	MHM	MS	NDUS1_MOUSE		79,7	144,0	16	24,5
	MHM	MS/MS	NDUS1_MOUSE		79,7	114,8	2	5,0
	PHM	MS	NDUS1_PANTR		79,5	70,1	13	25,2
	PHM	MS	NDUS1_MESAU		Fragment (20,7)	61,5	7	43,7
	PHM	MS/MS	NDUS1_GORGO		79,4	142,5	3	5,5
05	DHM	MS	NDUS1_PONAB	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	79,4	65,9	9	16,4
	DHM	MS	NDUS1_MACFA		79,5	65,7	11	17,7
	MHM	MS	NDUS1_MOUSE		79,7	73,0	9	12,8
	MHM	MS	NDUS1_MOUSE		79,7	57,7	9	16,9
	MHM	MS/MS	NDUS1_MOUSE		79,7	74,9	1	2,8
14	DHM	MS	NDUV1_BOVIN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1	50,6	79,9	14	25,9
	DHM	MS/MS	NDUS2_MESAU	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2	Fragment (15,9)	82,3	1	13,8

Tabelle 5.4: (Fortsetzung) Identifizierte Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase (Komplex I)

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
14	DKM	MS	NDUS2_MESAU	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2	Fragment (15,9)	115,2	2	20,3
	MHM	MS	NDUS2_MOUSE		52,6	70,8	12	34,6
	MHM	MS	NDUS2_MOUSE		52,6	78,1	14	30,7
	MHM	MS/MS	NDUS2_MOUSE		52,6	75,9	2	6,0
	PHM	MS/MS	NDUS2_MESAU		Fragment (15,9)	87,1	1	13,8
	WHM	MS/MS	NDUS2_MESAU		Fragment (15,9)	73,5	1	13,8
15	MHM	MS	NDUS2_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2	52,6	129,0	21	45,6
	MHM	MS	NDUS2_MOUSE		52,6	68,9	17	31,5
	MHM	MS/MS	NDUS2_MOUSE		52,6	205,3	4	14,3
25	DHM	MS/MS	NDUA9_BOVIN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9	42,8	64,2	1	3,2
	DKM	MS/MS	NDUA9_BOVIN		42,8	87,7	2	5,3
	MHM	MS	NDUA9_MOUSE		42,5	115,0	15	42,7
	MHM	MS	NDUA9_MOUSE		42,5	63,0	11	26,8
	MHM	MS/MS	NDUA9_MOUSE		42,5	120,7	2	5,8
26	MHM	MS	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9	42,5	117,0	15	46,2
	MHM	MS	NDUA9_MOUSE		42,5	60,4	10	22,8
	MHM	MS/MS	NDUA9_MOUSE		42,5	114,2	2	4,5
63b	PHM	MS	NDUS3_MESAU	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3	Fragment (11,1)	84,6	8	88,3
	PHM	MS	NDUS3_MESAU		Fragment (11,1)	82,7	6	56,4
95	WHM	MS/MS	NDUV2_GORGO	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2	27,3	65,8	2	13,3
96	MHM	MS	NDUB4_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	15,1	103,0	8	54,3
	MHM	MS	NDUB4_MOUSE		15,1	69,2	6	53,5
99	MHM	MS	NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	79,7	70,8	8	9,9
	MHM	MS	NDUS1_MOUSE		79,7	58,6	6	8,1
	PHM	MS	NDUS1_MESAU		Fragment (20,7)	73,0	6	26,3
113	DHM	MS	NDUS1_MESAU	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	Fragment (20,7)	85,1	6	41,6
115	DHM	MS	NDUB9_BOVIN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	21,8	65,6	8	21,2
	PHM	MS/MS	NDUV2_BOVIN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2	27,3	50,4	1	5,2
	WHM	MS/MS	NDUV2_MOUSE		27,3	44,8	1	8,1
118	DHM	MS	NDUS3_MESAU	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3	Fragment (11,1)	64,1	4	29,8
	WHM	MS	NDUS3_PONPY		30,1	98,2	10	27,4
	WHM	MS	NDUS3_MESAU		Fragment (11,1)	92,8	7	63,8
	WHM	MS/MS	NDUS3_PONPY		30,1	87,1	2	9,1

Die Cytochrom-*c*-Reduktase (Komplex III) ist aus zehn Untereinheiten aufgebaut (für Säugetiere)^[172, 178-181]: Dem Core Protein I und II (QCR1 und QCR2), Cytochrom b und c1, dem Rieske Eisen-Schwefel-Zentrum (UCRI), dem Ubiquinon Bindungsprotein (QCR7) und vier weiteren Untereinheiten.

In Tabelle 5.5 sind die identifizierten Untereinheiten von Komplex III dargestellt. Für DHM können insgesamt drei Proteinspots (drei verschiedene Untereinheiten), für MHM sieben Spots (vier Untereinheiten), für PHM drei Proteinspots (drei Untereinheiten), für WHM vier Spots (zwei Untereinheiten) und für DKM drei Spots (drei Untereinheiten) identifiziert werden. Bei den Superkomplexen können wiederum die meisten Untereinheiten nachgewiesen werden, besonders die Core Proteine I und II (QCR1 und QCR2, Spotnummer 16, 17, 23, 24 und 84) können sehr oft zugeordnet werden. Dies bestätigen auch die Ergebnisse von Gomez *et al.*^[177].

Tabelle 5.5: Identifizierte Untereinheiten der Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (Komplex III)

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot Score	P	SC [%]
16	DKM	MS	QCR2_BOVIN	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	48,1	92,7	2	6,2
17	MHM	MS	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	48,2	98,3	16	35,5
	MHM	MS	QCR2_MOUSE		48,2	73,0	13	30,0
	MHM	MS/MS	QCR2_MOUSE		48,2	200,7	2	6,2
23	MHM	MS	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	48,2	78,1	12	26,7
	MHM	MS	QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1	52,8	83,5	14	31,2
24	DHM	MS/MS	QCR2_BOVIN	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	48,1	41,6	1	4,0
35a	MHM	MS	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein	35,3	61,1	6	21,2
	MHM	MS/MS	CY1_MOUSE		35,3	84,4	2	9,8
	PHM	MS/MS	CY1_BOVIN		35,3	56,2	1	4,9
	WHM	MS/MS	CY1_BOVIN		35,3	168,0	3	13,5
63b	MHM	MS	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein	35,3	58,1	6	23,7
	MHM	MS/MS	CY1_MOUSE		35,3	77,2	2	9,8
	WHM	MS/MS	CY1_BOVIN		35,3	65,5	1	4,9
84	MHM	MS	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	48,2	63,7	6	15,5
	MHM	MS	QCR2_MOUSE		48,2	93,5	9	18,3
95	DHM	MS	UCRI_BOVIN	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	29,5	67,4	7	17,5
	DKM	MS	UCRI_BOVIN		29,5	86,2	8	20,4
	DKM	MS/MS	UCRI_RAT		29,4	45,0	1	8,0
	MHM	MS	UCRI_MOUSE		29,3	60,3	6	17,5
	PHM	MS/MS	UCRI_RAT		29,4	34,2	1	8,0
98	MHM	MS	UCRI_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	29,3	107,0	9	33,6
	MHM	MS	UCRI_MOUSE		29,3	78,0	8	33,2
108	DKM	MS	QCR7_BOVIN	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	13,5	79,4	8	59,5
	DKM	MS/MS	QCR7_BOVIN		13,5	37,0	1	9,0
	WHM	MS/MS	QCR7_PONAB		13,5	149,0	3	24,3
114	DHM	MS	QCR7_BOVIN	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	13,5	75,7	1	9,0
	PHM	MS/MS	QCR7_PONAB		13,5	131,0	3	24,3
	WHM	MS/MS	QCR7_PONAB		13,5	110,6	3	24,3

Auch bei der Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV) handelt es sich um einen konservierten Proteinkomplex. Bei Prokaryonten ist der Komplex aus vier Untereinheiten aufgebaut^[172]. Bei Säugetieren besteht Komplex IV aus 13 Untereinheiten, von denen COX1 bis COX3 mitochondrial codiert sind^[182]. Diese Untereinheiten sind verantwortlich für die katalytische Aktivität, das Pumpen von Protonen aus der Matrix und die Interaktion mit Cytochrom *c*. Die Funktionen der nuklear codierenden Untereinheit ist bisher noch nicht bekannt^[183]. Untersuchungen von Aras *et al.*^[184] deuten daraufhin, dass eine Isoform von COX4 als Sauerstoffsensor fungiert und dadurch die gesamte enzymatische Aktivität von Komplex IV reguliert wird. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Komplex IV aus Lungengewebe eine deutlich höhere Aktivität besitzt.

Die identifizierten Untereinheiten der Cytochrom-*c*-Oxidase sind in Tabelle 5.6 aufgelistet. Im Vergleich zu den anderen Komplexen ist hier die Anzahl der nachgewiesenen Untereinheiten deutlich geringer. Ergebnisse liegen hauptsächlich für die Proteinspots aus DHM und MHM vor. Bei PHM und DKM kann nur eine bzw. bei WHM keine Untereinheit identifiziert werden.

Tabelle 5.6: Identifizierte Untereinheiten der Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV)

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
50	DHM	MS	COX2_BALMU	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit 2	26,0	61,8	4	19,4
	DHM	MS/MS	COX2_CALGO		Fragment (24,8)	46,5	1	3,2
	MHM	MS	COX2_MOUSE		26,0	79,3	8	26,4
	MHM	MS/MS	COX2_MOUSE		26,0	103,9	2	7,5
53	DKM	MS	COX41_BOVIN	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit 4 isoform 1	19,6	61,3	6	25,4
54	DHM	MS/MS	COX5A_MOUSE	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit 5A	16,1	92,1	2	17,8
54a	DHM	MS	CX6B1_BOVIN	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit 6B1	10,1	69,5	5	32,6
	PHM	MS	COX6C_TARSY	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit 6C	8,5	65,6	5	48,0
94	MHM	MS	COX41_MOUSE	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit 4 isoform 1	19,5	105,0	9,7	49,7
	MHM	MS	COX41_MOUSE		19,5	56,3	5	37,3

Der Hauptteil des energiereichen Moleküls ATP wird von der ATP-Synthase (Komplex V) produziert^[28]. Dieses Protein kann nicht nur in den Mitochondrien von Eukaryonten, sondern auch in den Chloroplasten von Pflanzen und in Bakterien nachgewiesen werden^[185]. Der Aufbau ist bei allen genannten Beispielen sehr ähnlich. Das Protein setzt sich aus einem hydrophilen Kopf-Teil (F₁) und einem membranintegralen Teil (F₀) zusammen, die über einen integralen und einen peripheren Stiel miteinander verbunden sind. Für die mitochondriale ATP-Synthase in Säugetieren^[36] gestaltet sich der Aufbau wie folgt: Der F₁-Teil besteht aus den Untereinheiten α , β , γ , δ und ϵ im Verhältnis 3:3:1:1:1, der F₀-Teil ist aus dem c-Ring (8 bzw. 10 Kopien der Untereinheit c) und der Untereinheit a aufgebaut. Der periphere Stiel besteht aus den Untereinheiten b, d, F₆ und O, auch OSCP genannt. Obwohl dieser Enzymkomplex schon als Monomer katalytisch aktiv ist, wurden auch höhere

Homooligomere (Dimere, Trimere,...) gefunden^[64, 73, 186]. Besonders in den Krümmungen der Cristae der Mitochondrien ist die Konzentration dieser Oligomere deutlich erhöht. Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese Oligomere aufgrund ihrer räumlichen Form an der Ausbildung der Cristae beteiligt sind^[11, 71]. In *Saccharomyces cerevisiae* konnten beispielsweise weitere Untereinheiten (e, f, g, h, i und k) identifiziert werden, die an der Dimerisierung der ATP-Synthase beteiligt sind^[58].

Die mit Abstand meisten Proteine werden für die ATP-Synthase identifiziert. Insgesamt können zwanzig Proteinspots, davon sieben verschiedene Untereinheiten, zugeordnet werden. Bei fast allen Proben werden die α - und β -Untereinheiten (ATPA und ATPB) dem Monomer, dem Dimer, Trimer und Tetramer von Komplex V zugeordnet. Ebenso kann die Untereinheit O (für DHM und PHM) bei allen Oligomeren und die Untereinheiten γ (ATPG) und b1 (AT5F1) für das Monomer und das Dimer identifiziert werden. Für jeweils einen Proteinspot werden auch die Untereinheiten f (ATPK, bei DHM) und g (ATP5L, bei WHM) nachgewiesen.

Tabelle 5.7: Identifizierte Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V)

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
02	DHM	MS/MS	ATPA_PIG	ATP synthase subunit alpha	59,7	109,5	3	10,3
	DKM	MS	ATPA_PIG		59,7	89,2	10	22,8
	DKM	MS	ATPA_PIG		59,7	86,4	10	21,0
	DKM	MS/MS	ATPA_PIG		59,7	70,1	1	1,8
	MHM	MS	ATPA_MOUSE		59,7	76,8	11	29,3
	MHM	MS	ATPA_MOUSE		59,7	67,4	10	19,2
	PHM	MS	ATPA_PIG		59,7	120,0	20	43,9
	PHM	MS	ATPA_PIG		59,7	109,0	19	40,5
	WHM	MS	ATPA_PIG		59,7	214,0	23	47,4
	WHM	MS	ATPA_PIG		59,7	106,0	14	29,7
	WHM	MS/MS	ATPA_PIG		59,7	117,2	3	7,1
03	DHM	MS	ATPB_BOVIN	ATP synthase subunit beta	56,2	133,0	20	53,6
	DHM	MS/MS	ATPB_BOVIN		56,2	233,6	4	13,8
	DKM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	71,4	16	36,4
	DKM	MS	ATPB_HUMAN		56,5	62,4	15	33,6
	DKM	MS/MS	ATPB_MESAU		Fragment (39,4)	83,0	2	9,1
	PHM	MS	ATPB_RAT		56,3	152,0	26	48,0
	PHM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	148	26	42,2
	PHM	MS/MS	ATPB_MOUSE		56,3	136,3	2	7,2
	WHM	MS	ATPB_HUMAN		56,5	84,3	11	31,4
	WHM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	67,6	11	31,2
	WHM	MS/MS	ATPB_RAT		56,3	284,0	5	16,4
10	DHM	MS	ATPA_BOVIN	ATP synthase subunit alpha	59,7	185,0	23	44,7
	DKM	MS	ATPA_BOVIN		59,7	113,0	18	37,1
	DKM	MS/MS	ATPA_BOVIN		59,7	109,6	1	2,4
	MHM	MS	ATPB_MOUSE		59,7	282,0	31	52,8
	MHM	MS	ATPB_MOUSE		59,7	88,6	16	36,2
	MHM	MS/MS	ATPB_MOUSE		59,7	275,6	4	13,0

Tabelle 5.8: (Fortsetzung) Identifizierte Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V)

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
10	WHM	MS	ATPA_PIG	ATP synthase subunit alpha	59,7	121,0	15	33,3
	WHM	MS	ATPA_BOVIN		59,7	64,9	13	26,2
	WHM	MS/MS	ATPA_PIG		59,7	202,9	4	13,6
11	DHM	MS	ATPB_BOVIN	ATP synthase subunit beta	56,2	127,0	24	41,3
	DKM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	166,0	25	47,0
	DKM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	70,6	12	22,2
	DKM	MS/MS	ATPB_BOVIN		56,2	193,5	3	9,1
	MHM	MS	ATPB_MOUSE		56,2	275,0	35	70,3
	MHM	MS	ATPB_MOUSE		56,2	167,0	18	52,9
	MHM	MS/MS	ATPB_MOUSE		56,2	324,7	4	13,8
	PHM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	172,0	25	60,0
	PHM	MS	ATPB_HUMAN		56,5	172,0	24	54,6
	PHM	MS/MS	ATPB_BOVIN		56,2	117,7	2	9,5
	WHM	MS	ATPB_HUMAN		56,5	181,0	17	47,3
	WHM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	158,0	17	47,2
	WHM	MS/MS	ATPB_MESAU		Fragment (39,4)	177,5	2	9,7
12	DHM	MS	ATPA_BOVIN	ATP synthase subunit alpha	59,7	71,8	14	29,7
	DKM	MS	ATPA_PIG		59,7	155,0	24	41,0
	DKM	MS	ATPA_BOVIN		59,7	144,0	24	39,1
	DKM	MS/MS	ATPA_PIG		59,7	224,1	2	7,8
	MHM	MS	ATPA_MOUSE		59,7	73,8	16	30,9
	MHM	MS	ATPA_MOUSE		59,7	68,3	16	30,9
13	DKM	MS	ATPB_BOVIN	ATP synthase subunit beta	56,2	108,0	16	31,6
	DKM	MS/MS	ATPB_BOVIN		56,2	69,7	1	3,6
	MHM	MS	ATPB_MOUSE		56,3	276,0	37	72,2
	MHM	MS	ATPB_MOUSE		56,3	249,0	36	70,9
	MHM	MS/MS	ATPB_MOUSE		56,3	148,5	3	12,1
	WHM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	110,0	16	43,4
	WHM	MS	ATPB_HUMAN		56,5	93,1	15	38,4
	WHM	MS/MS	ATPB_MOUSE		56,3	258,7	3	12,1
31	DHM	MS	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta	56,2	64,0	13	22,7
	DHM	MS/MS	ATPB_MESAU		56,2	165,6	3	13,0
	DKM	MS/MS	ATPG_BOVIN	ATP synthase subunit gamma	33,1	98,4	2	6,4
	MHM	MS/MS	ATPG_MOUSE		32,9	142,4	2	8,4
	PHM	MS/MS	ATPG_RAT		30,2	37,4	1	3,7
	WHM	MS	ATPG_BOVIN		33,1	72,4	8	22,1
	WHM	MS/MS	ATPG_BOVIN		33,1	68,2	2	12,1
33	DHM	MS	ATPG_BOVIN	ATP synthase subunit gamma	33,1	116,0	10	39,3
	DHM	MS/MS	ATPG_PONAB		32,9	84,9	2	5,1
	DKM	MS	ATPG_BOVIN		33,1	96,2	8	38,3
	DKM	MS/MS	ATPG_RAT		30,2	49,6	1	3,7
	MHM	MS	ATPG_MOUSE		32,9	66,7	8	24,5
	MHM	MS/MS	ATPG_MOUSE		32,9	174,1	3	13,4
	PHM	MS/MS	ATPG_BOVIN		33,1	44,7	1	5,0
	WHM	MS/MS	ATPG_BOVIN		33,1	149,8	3	17,1
35b	DKM	MS/MS	AT5F1_BOVIN	ATP synthase F(0) complex subunit B1	28,8	81,5	1	3,1
	MHM	MS	AT5F1_MOUSE		28,9	105,0	17	47,7
	MHM	MS	AT5F1_MOUSE		28,9	64,5	15	43,8

Tabelle 5.9: (Fortsetzung) Identifizierte Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V)

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
35b	MHM	MS/MS	AT5F1_MOUSE	ATP synthase F(0) complex subunit B1	28,9	98,1	2	9,8
	PHM	MS/MS	AT5F1_BOVIN		28,8	78,5	1	3,1
	WHM	MS/MS	AT5F1_BOVIN		28,8	59,9	1	3,1
39	DHM	MS	ATPO_PIG	ATP synthase subunit O	23,4	74,5	8	40,8
	DHM	MS/MS	ATPO_BOVIN		23,3	157,7	3	15,5
	DKM	MS/MS	ATPO_BOVIN		23,3	69,8	1	6,6
	MHM	MS	ATPO_MOUSE		23,3	91,5	13	63,4
	PHM	MS/MS	ATPO_BOVIN		23,3	248,8	3	15,5
	WHM	MS	ATPO_PIG		23,4	89,6	12	55,9
	WHM	MS/MS	ATPO_BOVIN		23,3	41,0	1	6,6
40	DHM	MS	AT5F1_BOVIN	ATP synthase F(0) complex subunit B1	28,8	61,7	8	24,2
	DHM	MS/MS	AT5F1_BOVIN		28,8	66,1	2	6,6
	PHM	MS/MS	AT5F1_BOVIN		28,8	83,8	1	3,1
	WHM	MS/MS	AT5F1_BOVIN		28,8	57,3	1	3,1
	WHM	MS	ATPB_BOVIN	ATP synthase subunit beta	56,2	77,7	9	34,2
	WHM	MS	ATPB_MOUSE		56,3	62,0	9	34,1
41	DHM	MS	ATPO_PIG	ATP synthase subunit O	23,4	75,6	7	37,6
	DKM	MS	ATPO_PIG		23,4	77,7	10	52,1
	WHM	MS	ATPO_PIG		23,4	65,2	12	48,8
61b	DHM	MS/MS	ATPK_BOVIN	ATP synthase subunit f	10,3	85,0	1	14,8
	DKM	MS/MS	ATPA_BOVIN	ATP synthase subunit alpha	59,7	193,8	2	7,8
	DHM	MS/MS	ATP5L_BOVIN	ATP synthase subunit g	11,4	43,7	1	14,6
	WHM	MS/MS	ATP5L_BOVIN		11,4	53,5	1	19,4
88	DHM	MS	ATPB_BOVIN	ATP synthase subunit beta	56,2	159,0	21	40,7
	DHM	MS/MS	ATPB_BOVIN		56,2	138,3	3	9,3
	DKM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	69,1	10	27,7
	DKM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	66,8	10	23,7
	DKM	MS/MS	ATPB_BOVIN		56,2	270,8	5	14,0
	MHM	MS	ATPB_MOUSE		56,3	79,0	13	26,8
	MHM	MS	ATPB_MOUSE		56,3	77,1	17	33,6
	MHM	MS/MS	ATPB_MOUSE		56,3	254,0	5	16,4
	PHM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	113,0	15	29,9
	PHM	MS	ATPB_HUMAN		56,5	73,6	11	30,2
	PHM	MS/MS	ATPB_MOUSE		56,3	156,1	3	9,1
	WHM	MS	ATPB_BOVIN		56,3	81,4	11	30,9
	WHM	MS	ATPB_MOUSE		56,3	81,3	12	35,7
	WHM	MS/MS	ATPB_MESAU		56,3	76,5	1	3,9
89	DHM	MS	ATPA_BOVIN	ATP synthase subunit alpha	59,7	80,9	10	19,9
	WHM	MS/MS	ATPB_MESAU	ATP synthase subunit beta	Fragment (39,4)	43,4	1	3,9
92	MHM	MS	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta	56,3	150,0	11	31,8
	MHM	MS	ATPB_MOUSE		56,3	111,0	9	27,4
	MHM	MS/MS	ATPB_MOUSE		56,3	92,8	1	2,6
103	DHM	MS	ATPA_PIG	ATP synthase subunit alpha	59,7	87,4	15	26,4
	DHM	MS	ATPA_BOVIN		59,7	86,8	16	37,4
	DHM	MS/MS	ATPA_PIG		59,7	62,2	2	4,3
	DKM	MS	ATPA_BOVIN		59,7	63,9	11	23,3
	DKM	MS	ATPA_PIG		59,7	63,9	10	23,3
	DKM	MS/MS	ATPA_PIG		59,7	148,8	2	4,2

Tabelle 5.10: (Fortsetzung) Identifizierte Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V)

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
103	PHM	MS	ATPA_PIG	ATP synthase subunit alpha	59,7	219,0	30	59,3
	PHM	MS	ATPA_BOVIN		59,7	192,0	28	53,9
	WHM	MS	ATPA_PIG		59,7	149,0	21	41,8
	WHM	MS	ATPA_HUMAN		59,7	131,0	20	44,8
104	DHM	MS	ATPB_BOVIN	ATP synthase subunit beta	56,2	286,0	29	57,6
	DHM	MS/MS	ATPB_BOVIN		56,2	138,0	3	9,8
	DKM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	183,0	16	43,0
	DKM	MS	ATPB_MOUSE		56,3	165,0	15	40,3
	DKM	MS/MS	ATPB_BOVIN		56,2	143,0	3	9,8
	MHM	MS/MS	ATPB_MOUSE		56,3	81,8	2	6,2
	PHM	MS	ATPB_MOUSE		56,3	221,0	31	66,9
	PHM	MS	ATPB_HUMAN		56,5	220,0	32	61,4
	PHM	MS/MS	ATPB_MOUSE		56,3	226,4	4	16,6
	WHM	MS	ATPB_BOVIN		56,2	90,2	12	29,4
	WHM	MS	ATPB_MOUSE		56,3	90,1	13	31,4
	WHM	MS/MS	ATPB_MESAU		56,2	189,8	3	13,5
116	DHM	MS	ATPO_BOVIN	ATP synthase subunit O	23,3	64,6	6	25,8
	PHM	MS	ATPO_PIG		23,4	91,3	11	56,3
	PHM	MS	ATPO_PIG		23,4	93,6	12	54,9
119	PHM	MS	ATPO_PIG	ATP synthase subunit O	23,4	96,0	12	49,8
	PHM	MS	ATPO_PIG		23,4	68,1	8	36,2

Insgesamt werden sieben Proteine identifiziert, die im Zusammenhang mit dem Citratzyklus stehen (Tabelle 5.11). Hierbei handelt es sich um einen Prozess, bei dem durch Oxidation von Acetyl-CoA, das aus dem Abbau von Fettsäuren, Kohlenhydraten und Proteinen stammt, Reduktionsäquivalente (NADH und FADH₂) und Guanosintriphosphat (GTP) gebildet werden. In Eukaryonten finden diese Vorgänge in der mitochondrialen Matrix statt^[21]. Die Citrat-Synthase (CISY, identifiziert für DHM, PHM und MHM) ist das erste Enzym des Citratzyklus, es katalysiert eine Kondensationsreaktion von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat. Danach erfolgt in einem weiteren Schritt eine Isomerisierung zu Isocitrat durch die Aconitase (ACON, identifiziert für DHM, MHM und WHM). Dem schließt sich eine oxidative Decarboxylierung durch die Isocitrat-Dehydrogenase an, wobei NAD⁺ zu NADH reduziert wird. Die weitere Reaktion zu Succinyl-CoA wird von dem α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex durchgeführt. Bei diesem Protein handelt es sich um einen Multienzymkomplex, welcher aus der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, der Dihydrolipoyl-lysinrest-Succinyltransferase (ODO2, identifiziert für WHM) und der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLDH, identifiziert für DHM, PHM, MHM und WHM) aufgebaut ist^[187]. Auch hierbei wird NADH gebildet.

Nach zwei weiteren Reaktionen hydratisiert die Fumarase (FUMH, identifiziert für PHM und WHM) Fumarat zu Malat. Im letzten Schritt des Citratzyklus wird Malat von der Malat-Dehydrogenase (MDHM, identifiziert für DHM, PHM und MHM) wieder zu Oxalacetat oxidiert und NAD⁺ zu NADH reduziert.

Tabelle 5.11: Identifizierte Proteine des Citratzyklus

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
32b	PHM	MS	FUMH_PIG	Fumarate hydratase	50,0	102,0	11	21,9
	PHM	MS/MS	FUMH_PIG		50,0	168,8	2	8,8
	WHM	MS	FUMH_PIG		50,0	64,0	14	29,8
	WHM	MS/MS	FUMH_PIG		50,0	58,5	2	8,8
57	DHM	MS/MS	MDHM_BOVIN	Malate dehydrogenase	35,6	141,6	2	8,6
	MHM	MS	MDHM_MOUSE		35,6	87,8	11	34,0
	MHM	MS	MDHM_MOUSE		35,6	81,9	9	37,9
	PHM	MS	MDHM_PIG		35,6	105,0	15	40,5
	PHM	MS	MDHM_MOUSE		35,6	80,0	12	34,3
	PHM	MS/MS	MDHM_PIG		35,6	39,0	1	6,5
60	DHM	MS	CISY_PIG	Citrate synthase	51,6	117,4	2	4,5
	MHM	MS	CISY_MOUSE		51,7	97,0	15	27,6
	MHM	MS/MS	CISY_MOUSE		51,7	168,6	2	5,8
	PHM	MS/MS	CISY_PIG		51,6	112,0	2	4,5
63	DHM	MS	ACON_BOVIN	Aconitate hydratase	85,3	142,0	18	27,7
	DHM	MS	ACON_RAT		85,4	126,0	17	23,6
	DHM	MS/MS	ACON_BOVIN		85,3	91,7	2	3,7
	MHM	MS	ACON_MOUSE		85,4	201,0	24	35,1
	MHM	MS	ACON_MOUSE		85,4	58,7	15	19,6
	WHM	MS	ACON_PIG		85,7	66,8	16	22,7
	WHM	MS/MS	ACON_BOVIN		85,3	90,7	2	3,7
71	PHM	MS	ACAD8_HUMAN	Isobutyryl-CoA dehydrogenase	45,0	63,1	5	12,3
	DHM	MS	DLDH_CANFA	Dihydrolipoyl dehydrogenase	54,1	79,7	7	15,3
	DHM	MS	DLDH_CANFA		54,1	72,2	8	18,9
	DHM	MS/MS	DLDH_PONAB		54,1	111,2	3	5,9
	MHM	MS	DLDH_MOUSE		54,2	85,2	10	21,2
	MHM	MS	DLDH_MOUSE		54,2	80,4	9	19,4
	PHM	MS	DLDH_PIG		54,2	67,2	7	14,9
	PHM	MS/MS	DLDH_MESAU		Fragment (50,7)	46,0	1	2,3
	WHM	MS	DLDH_PIG		54,2	117,0	16	27,7
	WHM	MS	DLDH_CANFA		54,1	100,0	16	27,5
	WHM	MS/MS	DLDH_MESAU		Fragment (50,7)	161,2	3	10,2
109	DKM	MS/MS	DHE3_HUMAN	Glutamate dehydrogenase 1	61,4	116,8	2	4,5
122	WHM	MS	ODO2_HUMAN	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase	48,7	90,3	13	26,9
	WHM	MS	ODO2_PIG		48,9	85,1	13	24,4

Das Hitzeschockprotein, auch HSP60 genannt, gehört zu einer Klasse von Proteinen, die sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vorkommen^[188]. Ihre Aufgabe besteht darin, der Denaturierung von anderen Proteinen bei erhöhten Temperaturen entgegenzuwirken. Das Protein HSP60 ist aus 14 identischen Untereinheiten (je 60 kDa) aufgebaut, die jeweils zwei ringförmige Strukturen als Heptaoligomere bilden.^[189] Beispielsweise führt eine Erhöhung der Anzuchttemperatur von *Escherichia coli* von 37 °C nach 45 °C zu einem Anstieg der Proteinmenge von HSP60 um den Faktor 7^[190]. Dieses Protein kann bei MHM, PHM, WHM und DKM identifiziert werden (Tabelle 5.12).

Tabelle 5.12: Identifizierte Hitzeschockproteine

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
43	DKM	MS	CH60_MESAU	60 kDa heat shock protein	Fragment (29,0)	75,9	8	39,1
	DKM	MS	CH60_PONAB		61,0	70,7	10	23,6
	DKM	MS/MS	CH60_MESAU		Fragment (29,0)	130,3	2	15,9
	MHM	MS	CH60_MOUSE		60,9	72,6	9	18,3
	MHM	MS	CH60_MOUSE		60,9	60,2	8	15,2
	MHM	MS/MS	CH60_MOUSE		60,9	89,0	2	5,9
	PHM	MS	CH60_MESAU		Fragment (29,0)	70,1	10	39,1
	PHM	MS/MS	CH60_MOUSE		60,9	183,8	2	3,3
	WHM	MS	CH60_BOVIN		61,1	74,2	7	19,7
	WHM	MS	CH60_MESAU		Fragment (29,0)	72,6	8	35,1
	WHM	MS/MS	CH60_MESAU		Fragment (29,0)	125,0	2	15,9

Der Abbaumechanismus von Fettsäuren wird als β -Oxidation bezeichnet (identifizierte Proteine in Tabelle 5.13). Triacylglyceride werden durch Lipasen zu Fettsäuren und Glycerin hydrolysiert. Für die weiteren Stoffwechselvorgänge müssen die Fettsäuren zunächst aktiviert werden. Dies geschieht über eine Thioesterbindung zwischen der Carboxylgruppe der Fettsäure und der Thiolgruppe von Coenzym A. Das hierbei gebildete Molekül wird als Acyl-CoA bezeichnet. Nach dem Transport zu den Mitochondrien wird in einem ersten Schritt die Bindung zwischen dem α und dem β -Kohlenstoffatom (Carboxy-Seite) oxidiert. Als Nächstes erfolgt eine Hydratisierung durch die Enoyl-CoA Hydratase (ECHM, identifiziert für DKM). Nach einer Oxidation durch die 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und einer Thiolyse durch die β -Ketothiolase wird ein um zwei Kohlenstoffatome verkürztes Acyl-CoA und ein Acetyl-CoA gebildet^[21]. Das Acetyl-CoA wird dem Citratzyklus zugeführt und kann zur Herstellung von Reduktionsäquivalenten genutzt werden (siehe vorher). Alle diese Enzyme sind Teil eines Multienzymkomplexes, der als Mitochondriales Trifunktionales Enzym bezeichnet wird^[191]. Für DHM, DKM und MHM kann die β -Untereinheit dieses Enzyms (ECHB) identifiziert werden.

Das Enzym "Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase" (ACADM, identifiziert für PHM) katalysiert die erste Oxidation von C4 bis C12-Fettsäuren^[192], während das Protein "Long-chain fatty acid transport protein 4" (S27A4, identifiziert für DKM) für den Transport von Fettsäuren über die Plasmamembran in den mitochondriale Matrix verantwortlich ist^[193, 194].

Tabelle 5.13: Identifizierte Proteine der β -Oxidation

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
67b	DKM	MS/MS	ECHM_BOVIN	Enoyl-CoA hydratase	31,2	118,6	2	11,7
95b	DKM	MS	S27A4_MOUSE	Long-chain fatty acid transport protein 4	72,3	71,7	16	24,4
98b	DHM	MS	ECHB_BOVIN	Trifunctional enzyme subunit beta	51,3	80,0	9	23,4
	DKM	MS	ECHB_BOVIN		51,3	93,3	12	29,9
	DKM	MS/MS	ECHB_BOVIN		51,3	68,7	2	3,8
	MHM	MS	ECHB_MOUSE		51,3	110,0	19	45,9
	MHM	MS	ECHB_MOUSE		51,3	94,9	15	33,9
121	PHM	MS	ACADM_PIG	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	46,5	68,3	11	24,5

Die ADP/ATP-Translokase (ADT1, identifiziert für DHM, DKM, PHM und MHM) und das Phosphatcarrierprotein (MPCP, identifiziert für MHM, PHM) regeln den Transport von ADP, ATP und Phosphat-Ionen in die mitochondriale Matrix^[195, 196]. Untersuchungen von Nuskova *et al.*^[197] und Chen *et al.*^[198] deuten darauf hin, dass diese Enzyme an der Ausbildung von ATP-Synthasomen beteiligt sind. Dabei handelt es sich um einen Superkomplex bestehend aus den oben genannten Proteinen und dem Komplex V der mitochondrialen Atmungskette, der ATP-Synthase.

Tabelle 5.14: Identifizierte Transportproteine

ID	Gewebe	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
95b	DHM	MS/MS	ADT1_RABIT	ADP/ATP translocase 1	32,9	72,6	1	3,0
	DKM	MS/MS	ADT1_RABIT		32,9	73,3	1	3,0
	MHM	MS	ADT1_MOUSE		32,9	72,7	12	35,2
	PHM	MS	ADT1_BOVIN		32,9	61,5	5	15,1
	MHM	MS	MPCP_MOUSE	Phosphate carrier protein	39,6	59,2	13	25,5
	PHM	MS/MS	MPCP_RAT		39,4	44,6	1	3,4
110	DKM	MS	ADT1_RAT	ADP/ATP translocase 1	33,0	77,8	10	27,5

Für die hier dargestellten Ergebnisse wurden von DHM, MHM, PHM, WHM und DKM jeweils 59 Proteinspots an identischen Stellen auf den 2-D BN/SDS-Gelen ausgeschnitten. Da alle Proben ein ähnliches Laufverhalten zeigen, sollte untersucht werden, ob auch die gleichen Proteine bzw. die gleichen Untereinheiten nachgewiesen werden können. Es können abhängig vom Gewebe zwischen 29 und 36 Proteinspots nachgewiesen werden (statistisch signifikant). Bei MHM können die meisten Spots (insgesamt 36, Abbildung 5.29 A) identifiziert werden.

In Abbildung 5.29 B ist die Anzahl der identifizierten Spots für die Komplexe I, III, IV und V für die untersuchten Proben dargestellt. Zusätzlich ist in orange die Anzahl der identischen Spots, die mindestens in 3 Geweben signifikant nachgewiesen werden können, gezeigt. Die mit Abstand meisten Proteinspots können für die ATP-Synthase gefunden werden. Es können die Untereinheiten α , β , γ , b1 und O den Monomeren V_1 , Dimeren V_2 , Trimeren V_3 und sogar den Tetrameren V_4 zugeordnet werden. Hierbei handelt es sich bei 13 Spots um identische

Untereinheiten. Für Komplex I und III können dementsprechend zwischen 3 und 7 Spots abhängig von der Probe identifiziert werden, davon jeweils 3 identische. Für Komplex IV können nur bei DHM und MHM mehr als eine Untereinheit nachgewiesen werden. Interessanterweise kann die Untereinheit COX1 (Spotnr. 47), die bei allen 2-D Gelen als dicker Proteinspot im Bereich zwischen 30 und 45 kDa zu sehen ist, bei keiner Probe identifiziert werden.

Des Weiteren können auch Proteine des Citratzyklus, des Fettsäureabbaus (β -Oxidation), Transportproteine und Hitzeschockproteine (Abbildung 5.29 C) nachgewiesen werden.

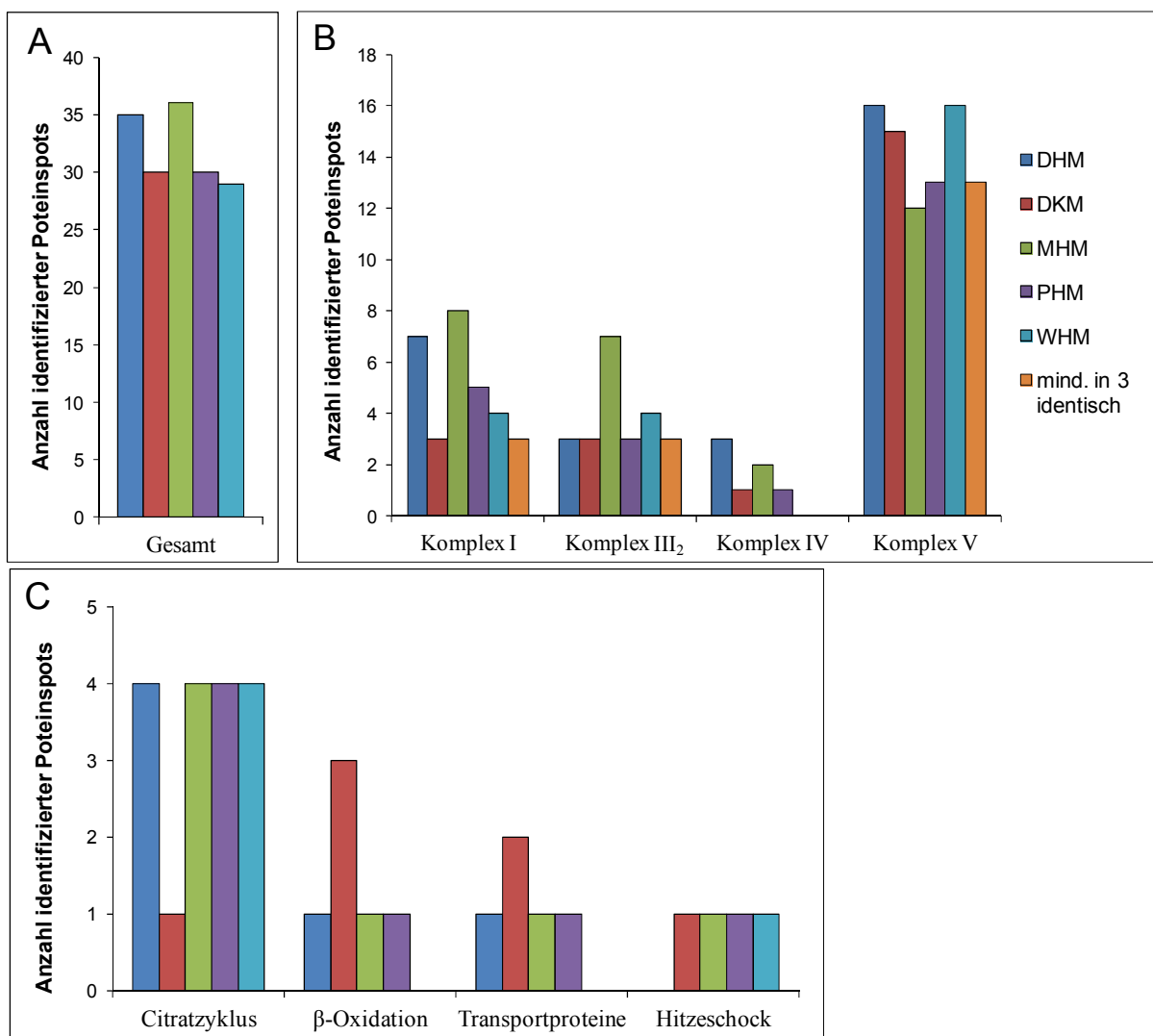
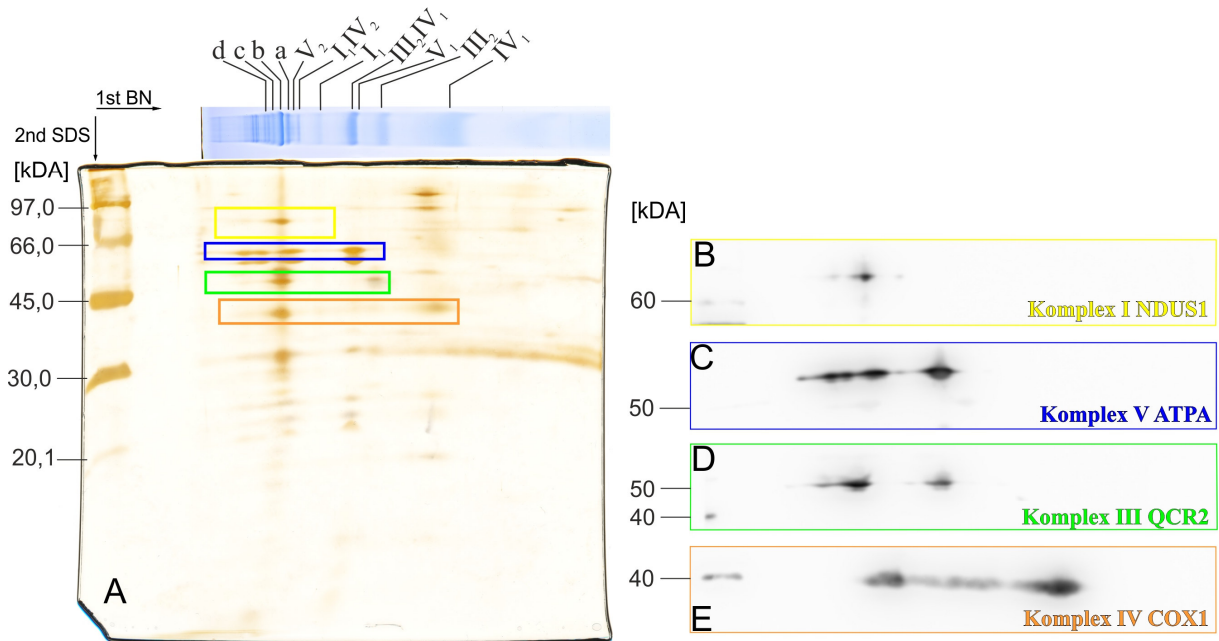


Abbildung 5.29: Anzahl der mittels PMF identifizierten Proteinspots für DHM, DKM, MHM, PHM und WHM. Gesamtanzahl aller identifizierten Spots (A) und zugeordnet zu den OxPhos-Komplexen I, III₂, IV und V (B). Anzahl identifizierter Spots für die Proteine des Citratzyklus, der β -Oxidation von Fettsäuren, Transportproteine und für das Hitzeschockprotein HSP60 (C). In orange sind die Anzahl der identischen Spots, die mindestens in 3 Geweben nachgewiesen werden können (mind. in 3 identisch).

5.1.4.1 2-D Western Blots

Im Folgenden werden 2-D Western Blots für die OxPhos-Komplexe von DHM, MHM, PHM und WHM gezeigt. Hierbei sollen zusätzlich Proteinspots zugeordnet werden, die nicht mittels MALDIS-MS identifiziert werden konnten. Die entsprechende Spotnr. bezieht sich auf die in Abbildung 5.24 bis 5.28 dargestellten großen 2-D BN/SDS-Gele, die für eine PMF-Analyse verwendet wurden. Da bei den hier untersuchten Proben DHM ein ähnliches Laufverhalten in den 2-D Gelen wie BHM zeigt, werden zuerst diese Ergebnisse vorgestellt. 2-D Western Blots von BHM sind in der Dissertation von Victoria Decker^[139] zu finden.



Superkomplex a (MS Spotnr. 05). Zusätzlich können die Proteinspots Nr. 07 (I₁) und Nr. 99 (I₁III₂IV₂, a) anhand dieses Blots zugeordnet werden.

Auch für Komplex II wurde ein Western Blot angefertigt, allerdings hat der Primärantikörper bei DHM nicht gebunden (Daten nicht gezeigt).

Für Komplex III wurde ein Antikörper gegen die Untereinheit QCR2 (~ 48 kDa) verwendet. Bei dem Schmier rechts handelt es sich um den individuellen Komplex III₂ (MS Spotnr. 24). Bei den anderen Spots handelt es sich wahrscheinlich um die Superkomplexe a bis d, eine genaue Zuordnung ist anhand des Blots allerdings nicht möglich.

Ein Antikörper gegen COX1 (~ 57 kDa) wurde für den Nachweis der Cytochrome-*c*-Oxidase eingesetzt. Die zahlreichen Proteinspots zeigen deutlich, dass diese Untereinheit von Komplex IV sowohl in vielen Assemblierungen von Superkomplexen als auch in individueller Form und in Homooligomeren (IV₂) zu finden ist. Bezugnehmend auf das Silber-gefärbte 2-D Gel werden nur die Spots für den individuellen Komplex IV₁, das Dimer IV₂ und den Superkomplex III₂IV₁ (MS Spotnr. 47, 30 und 29) zugeordnet.

Anhand des Blots gegen die α -Untereinheit von Komplex (ATPA, ~ 59 kDa) können der individuelle Komplex (MS Spotnr. 12) und andere oligomere Formen der ATP-Synthase (MS Spotnr. 02, 10, 103) nachgewiesen werden. Besonders gut sind das Monomer V₁ und das Dimer V₂ zu erkennen. Vergleicht man die Intensitäten dieser Spots, scheint der Anteil an Monomeren höher zu sein. Des Weiteren sind Spots für das Trimer V₃ und das Tetramer V₄ zu sehen. Da diese allerdings sehr dicht beieinander liegen, ist eine eindeutige Zuordnung nur bedingt möglich. Ein Grund dafür könnte darin zu finden sein, dass für diese Blots mittlere 2-D Gele verwendet wurden. Betrachtet man im Vergleich dazu das große 2-D Gel von DHM (Abbildung 5.24), dann sind die Untereinheiten für das Trimer und Tetramer zweifelsfrei zuordenbar. Auf dem Western Blot ist ein weiteres Signal links neben V₄ zu erkennen, hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein höheres Oligomer der ATP-Synthase, z.B. das Pentamer V₅ oder das Hexamer V₆. Bei einem Vergleich der Intensitäten für den individuellen Komplex V₁ und die höheren Assemblierungen (V₂-V₄) fällt auf, dass die ATP-Synthase hauptsächlich in oligomerer Form vorliegt.

Sowohl das Silber-gefärbte 2-D BN/SDS-Gel als auch der 2-D Western Blot von MHM (Abbildung 5.31) zeigen, dass die Untereinheit NDUS1 von Komplex I bei Superkomplex a, b und c (MS Spotnr. 04, 05, 99) und bei dem individuellen Komplex (MS Spotnr. 07) nachgewiesen werden können. Im Gegensatz zu dem vorher dargestellten Blot von DHM gegen NDUS 1 besitzen die Spots für den Superkomplex a und b eine ähnliche Intensität. Dies deutet darauf hin, dass beide Assemblierungen in einem ähnlichen Verhältnis vorliegen. Der Spot für den individuellen Komplex I₁ zeigt nur eine schwache Intensität, ebenso wie der Superkomplex c. Vergleicht man auch hier die Intensitäten zwischen dem individuellen Komplex und den Superkomplexen, so ist zu erkennen, dass der größte Teil von Komplex I in Form von Superkomplexen gebunden ist und nur eine geringe Menge in individueller Form vorliegt. Ähnliche Erkenntnisse wurden bereits bei DHM (s.o.) gefunden.

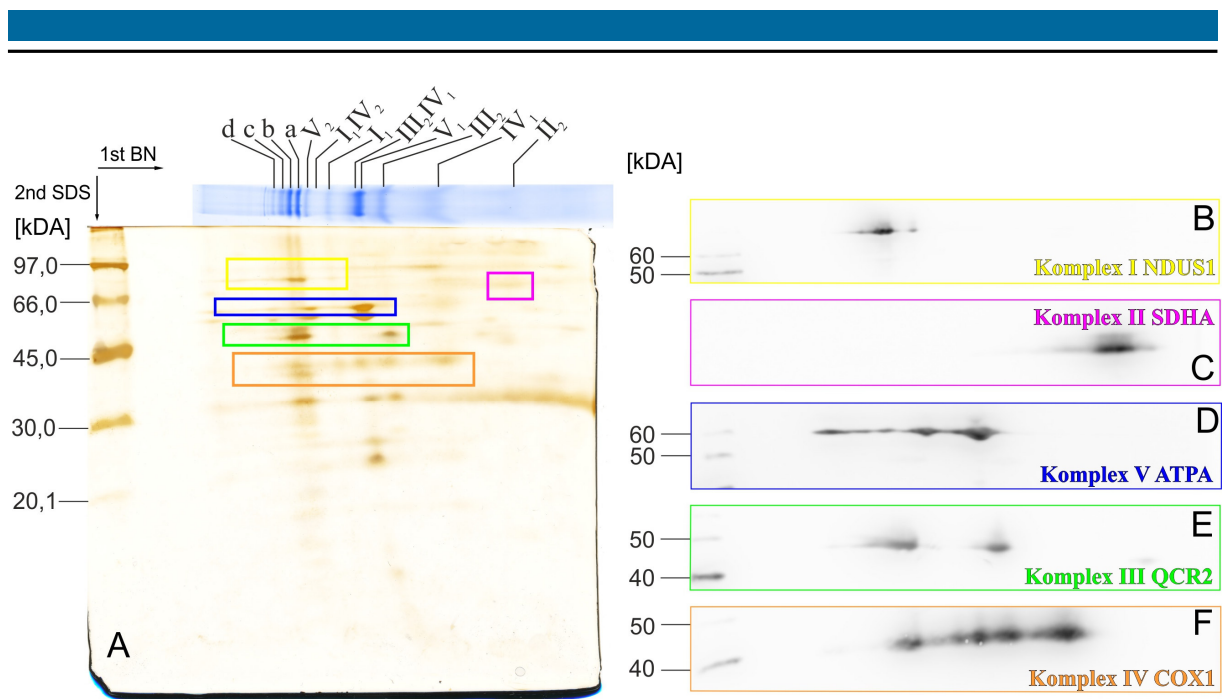


Abbildung 5.31: 2-D Western Blots der OxPhos-Komplexe I, II, III, IV und V von MHM. Es wurden 30 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 4 g/g) von MHM mittels 2-D BN/SDS PAGE (mittlere Größe) aufgetrennt. **A:** Silber-gefärbtes 2-D Gel, ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das Gel gelegt; **B:** Western Blot gegen NDUS1 (Komplex I) **C:** Western Blot gegen SDHA (Komplex II); **D:** Western Blot gegen ATPA (Komplex V); **E:** Western Blot gegen QCR2 (Komplex III); **F:** Western Blot gegen COX1 (Komplex IV). Als Massensstandards wurde der LMW-Marker verwendet (**A**) bzw. der MagicMark™ XP (**B - F**) verwendet. Die vollständigen Western Blots sind im Anhang (**Abbildung 8.6**) dargestellt. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁I₁I₂, b = I₁I₁I₂IV₁, c = I₁I₁I₂IV₂, d = I₁I₁I₂IV₃. Diese Western Blots wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] hergestellt.

Im Vergleich mit den anderen OxPhos-Komplexen ist die Succinyl-Dehydrogenase (Komplex II) mit ca 130 kDa der kleinste Enzymkomplex der Atmungskettenkomplexe^[199]. Der hier verwendete Antikörper bindet an die Untereinheit a (SDHA, ~ 70 kDa). Anhand des Blots ist zu erkennen, dass Komplex II nur als individueller Komplex (MS Spotnr. 81) vorliegt (bei BN-PAGE in der ersten Dimension). Kovářová *et al.*^[200] haben Experimente mit solubilisierten Mitochondrien aus Geweben (humane Fibroblasten und Rattenherz) und verschiedenen Zelllinien (HEK293 und rhoO) in CN-Gelen durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass Komplex II enzymatisch aktive Komplexe in einem Bereich zwischen 500 und 1000 kDa bildet. Eine eindeutige Zuordnung, ob es sich dabei um Homooligomere von Komplex II oder um einen Superkomplex mit Komplex IV bzw. V handelt, konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Für Komplex III ist ein ähnliches Spotmuster wie bei DHM zu erkennen. Allerdings ist hier eine eindeutigere Zuordnung zu den Superkomplexen a und b (MS Spotnr 16, 17) und zu dem individuellen Komplex III₂ (MS Spotnr. 24) möglich. Vergleicht man die Intensitäten dieser Spots, so ist zu erkennen, dass Komplex III sowohl in individueller Form als auch in den Superkomplexen in einem ähnlichen Verhältnis vorliegt.

Für Komplex IV werden wie bei DHM nur die Spots für den individuellen Komplex IV₁, das Dimer IV₂ und den Superkomplex III₂IV₁ ausgewertet.

Anhand des immunologischen Nachweises der α -Untereinheit der ATP-Synthase können der individuelle Komplex V_1 und seine Homooligomere nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu DHM zeigt sich für MHM jedoch eine deutlich andere Verteilung bei den Dimeren V_2 , Trimeren V_3 und Tetrameren V_4 (bezogen auf die Intensität des Proteinspots der α -Untereinheit). Während bei DHM das Monomer und das Dimer ein ähnlich starkes Signal liefern, besitzt bei MHM der Spot für das Monomer eine höhere Intensität als das Dimer. Ebenso zeigen das Tetramer und das Trimer deutlich niedrigere Intensitäten. Bei einem Vergleich zwischen V_1 und den Homooligomeren V_2 - V_4 ist zu erkennen, dass das Monomer eine höhere Intensität besitzt.

In Abbildung 5.32 sind die 2-D BN/SDS-Gele und zugehörigen Western Blots von PHM und WHM dargestellt. Die beiden Silber-gefärbten Gele zeigen für beide Proben eine sehr ähnliches Laufverhalten. Bei WHM wurde kein Western Blot gegen die α -Untereinheit von Komplex V angefertigt.

Anhand des Blots gegen die Untereinheit NDUS1 können für beide Proben die Superkomplexe a, b, und c (MS Spotnr. 04, 05, 99) und der individuelle Komplex I_1 (MS Spotnr. 07) nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei DHM besitzt der Spot für den Superkomplex b die höchste Intensität. Bei den Superkomplexe a und c ist die Intensität deutlich schwächer, ebenso besitzt der individuelle Komplex nur ein sehr schwaches Signal. Wie bereits bei DHM und MHM zu sehen, ist Komplex I hauptsächlich in Form von Superkomplexen gebunden ist.

Der Blot für Komplex II zeigt für PHM und WHM ähnlich wie bei MHM einen Spot bzw. Schmier für die Untereinheit a der Succinyl-Dehydrogenase.

Bei PHM besitzt der Western Blot gegen die Untereinheit QCR2 von Komplex III ein sehr hohes Hintergrundsignal. Ebenso zeigen Untereinheiten im Bereich von 40 kDa ein positives Signal. Hierbei handelt es sich um eine Verunreinigung des Primärantikörpers, der Spuren eines Antikörpers gegen die Untereinheit COX1 von Komplex IV enthält. Dies ist sehr gut in dem darunter liegenden Blot (Abbildung 5.32 E) zu erkennen. Beide Blots zeigen ein sehr ähnliches Spotmuster in diesem Bereich. Sowohl im Bereich der Superkomplexe als auch bei dem individuellen Komplex III_2 sind Spots für die Untereinheit QCR2 nur sehr schlecht zu erkennen. Daher ist eine eindeutige Zuordnung bzw. eine Aussage über die Intensität der Spots nicht möglich. Bei dem Blot gegen QCR2 von WHM (Abbildung 5.32 J) ist im Bereich des individuellen Komplexes III_2 und der Superkomplexe (wahrscheinlich b) jeweils ein Proteinspot zu sehen. Beide Spots zeigen eine ähnliche Intensität.

Anhand des Western Blots gegen die Untereinheit COX1 von Komplex IV werden bei beiden Proben die Spots für den individuellen Komplex IV_1 , das Dimer IV_2 und den Superkomplex III_2IV_1 (MS Spotnr. 47, 30 und 29) zugeordnet. Ähnlich wie bei den Blots von MHM und DHM sind im Bereich der Superkomplexe sehr viele Spot zu erkennen. Während bei PHM alles Spot in diesem Bereich eine ähnliche Intensität besitzen, sind bei WHM 2 Spots zu sehen, die im Vergleich zu den anderen eine deutliche höhere Intensität besitzen. Um eine

genaue Aussage über die Zusammensetzung dieser Assemblierungen zu treffen sind weitere Experimente notwendig, wahrscheinlich handelt es sich bei einem der Spot um den Superkomplex b.

Da für WHM kein Western Blot für Komplex V angefertigt worden ist, beziehen sich die folgenden Erkenntnisse auf PHM (Abbildung 5.32 D). Es können der individuelle Komplex (MS Spotnr. 12) und die Homooligomere der ATP-Synthase (MS Spotnr. 02, 10, 103) nachgewiesen werden. Im Bereich des Dimers V_2 , Trimeren V_3 und Tetramern V_4 sind die Proteinspots verschmiert und sehr dicht nebeneinander, ähnlich wie bei DHM ist bei V_3 und V_4 keine eindeutige Trennung der Spots möglich. Es ist allerdings zu sehen, dass die Intensität der Spots für das Monomer und das Dimer ähnlich hoch sind. Vergleicht man auch hier das Verhältnis zwischen Monomer und Oligomer, so ist zu erkennen, dass der Hauptteil der ATP-Synthase in Form von Dimeren, Trimeren und Tetrameren vorliegt.

Zusammenfassend lässt sich für die Western Blots sagen, dass die solubilisierten OxPhos-Komplexe I und III aus DHM, PHM und WHM ein sehr ähnliches Laufverhalten (bezogen auf das Verhältnis zwischen individuellem Komplex und Superkomplex) in 2-D BN/SDS-Gelen besitzen. Für die Untereinheit QCR2 von Komplex III zeigt sich, dass die Spots für den individuellen Komplex III_2 und im Bereich der Superkomplexe eine ähnliche Intensität besitzen. Ebenfalls ist für die Untereinheit NDUS1 von Komplex I zu sehen, dass der mit Abstand größte Teil von Komplex I (bezogen auf die Proteinmenge) in Superkomplex b gebunden ist. Diese Erkenntnisse stimmen mit den in der Arbeitsgruppe gefundenen Ergebnissen für BHM^[139] und RBM^[3] (Rattenhirnmitochondrien) überein. Für den Komplex V können nur Aussagen für die Proben aus Reh- und Schweineherz getroffen werden. Dementsprechend ist bei diesen Proben zu erkennen, dass der Anteil von ATP-Synthase in oligomerer Form höher ist als in monomerer Form.

Im Gegensatz dazu sind für MHM einige Unterschiede bei den Western Blots gegen die OxPhos-Komplexe I und V zu sehen. Anhand des Blot für Komplex I ist zu erkennen, dass die Proteinspots der Superkomplexe a und b in einem ähnlichen Verhältnis vorliegen und eine deutliche höhere Intensität als der individuelle Komplex I_1 besitzen. Des Weiteren zeigt sich für die α -Untereinheit von Komplex V, dass der Spot für das Monomer der ATP-Synthase eine höhere Intensität besitzt als die Spots der Homooligomere. Besonders die Trimere V_3 und Tetramere V_4 zeigen eine deutlich schwächere Intensität als bei DHM und PHM.

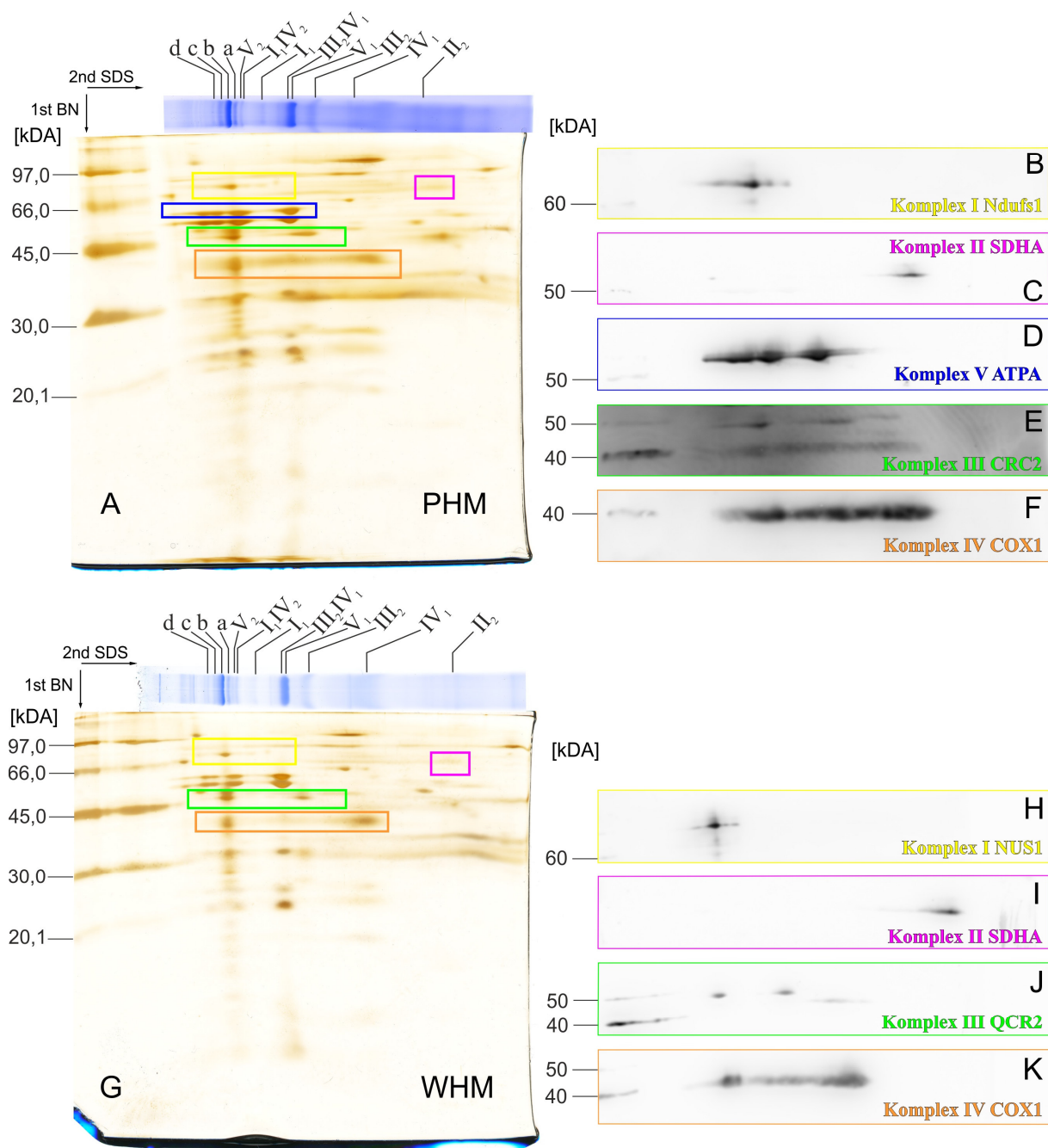


Abbildung 5.32: 2-D Western Blots der OxPhos-Komplexe I, II, III, IV und V von PHM (A - F) und WHM (G - K). Es wurden jeweils 30 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von PHM bzw. WHM mittels 2-D BN/SDS PAGE (mittlere Größe) aufgetrennt. **A, G:** Silber-gefärbtes 2-D Gel, ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das Gel gelegt; **B, H:** Western Blot gegen NDUS1 (Komplex I) **C, I:** Western Blot gegen SDHA (Komplex II); **D:** Western Blot gegen ATPA (Komplex V); **E, J:** Western Blot gegen QCR2 (Komplex III); **F, K:** Western Blot gegen COX1 (Komplex IV). Als Massenstandards wurde der LMW-Marker verwendet (**A, G**) bzw. der MagicMark™ XP (**B - E, H - K**) verwendet. Die vollständigen Western Blots sind im Anhang (**Abbildung 8.7** bzw. **8.8**) dargestellt. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃. Diese Western Blots wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] hergestellt.

5.1.5 Quantitative Analyse des mitochondrialen Proteoms in 2-D BN/SDS-Gelen

5.1.5.1 Auswertung

Für die Vorgehensweise bei der quantitativen Auswertung von Proteinen in 2-D BN/SDS-Gelen sei auf den Abschnitt 4.11.1 verwiesen. Von den untersuchten Proben wurden jeweils 120 µg Protein (vor Solub.) mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Für BHM, DHM, PHM, WHM, BHM_{alt}, BHM_{FG} und R_FHM wurde ein Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g und für MHM 4 g/g verwendet. Es wurden pro Probe 3 technische Replikate hergestellt, die Gelbilder sind im Anhang (Abbildung 8.9 bis 8.12) gezeigt. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro[®] Ruby (Abschnitt 4.7.3) gefärbt. Die Graustufenbilder wurden unter Verwendung des CCD-Kamerasystems LAS-3000, bei einer Anregungswellenlänge $\lambda = 460$ nm, einem Emissions-Filter mit $\lambda = 605$ nm und der Blendenzahl $F = 0,85$ aufgenommen. Anschließend wurden die Gelbilder mit der Software Delta 2D ausgewertet. Aus der Überlagerung der technischen Replikate einer Probe wird ein Fusionsbild erstellt. In Abbildung 5.33 ist ein solches Bild beispielhaft für BHM gezeigt. Für eine bessere Darstellung der für die Auswertung verwendeten Proteinspots sind diese farbig entsprechend der Legende in der Abbildung gezeigt. Die ausgewählten Spots basieren auf den Ergebnissen der Identifizierung mittels PMF in Abschnitt 5.1.4. Dementsprechend werden auch die Nummerierungen aus diesem Abschnitt übernommen und können den jeweiligen Untereinheiten zugeordnet werden.

Die Intensitäten dieser Spots werden im Folgenden als relative Graustufenwerte V% [rel. GU] dargestellt. Als Näherung werden diese Werte als Proteinmenge des jeweiligen Spots bezogen auf die auf das Gel aufgetragene Gesamtproteinmenge angesehen. Soll die Gesamtmenge eines Komplexes oder eines Superkomplexes analysiert werden, muss die Summe aus den zugehörigen Untereinheiten gebildet werden. Die erhaltenen Werte aller untersuchten Proben werden auf die Gesamtproteinmenge auf dem 2-D Gel normiert. Aus diesen Daten werden die Mittelwerte der technischen Replikate berechnet und als Balkendiagramme dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler dar. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Ein statistisch signifikanter Unterschied wird mit stat. sig. abgekürzt, ein nicht signifikanter Unterschied mit stat. n. sig.

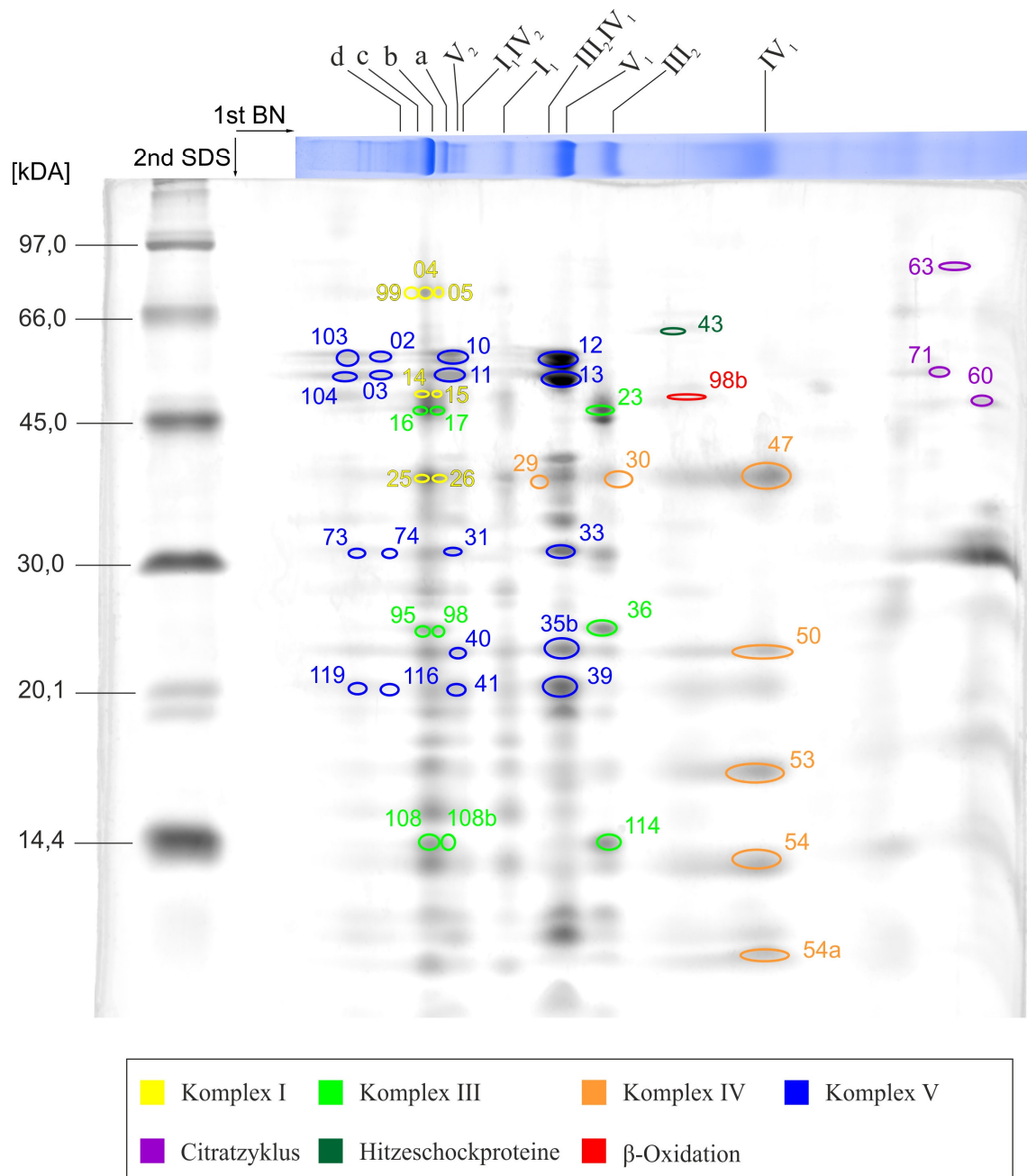


Abbildung 5.33: Fusionsbild für die Quantifizierung von OxPhos-Komplexen und anderen Proteinen von BHM in 2-D BN/SDS-Gelen. Dieses Bild wurde von Delta2D berechnet, hierbei handelt es sich um eine Überlagerung von technischen Replikaten (n = 3) von mit Sypro® Ruby gefärbten 2-D Gelen von BHM (120 µg Protein, vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 3 g/g). Die farbige Zuordnung der Proteinspots zu den entsprechenden Komplexen, Superkomplexen und Homooligomeren basiert auf den in Abschnitt 5.1.4 erhaltenen Ergebnissen. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links). Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

5.1.5.2 Herzmitochondrien aus Rind, Reh, Schwein und Wildschwein

5.1.5.2.1 Komplex V

Für die Synthese des wichtigsten Energieträgers ATP ist Komplex V der mitochondrialen Atmungskette, die ATP-Synthase, verantwortlich^[201]. Angetrieben von einem Protonengradienten, der durch die anderen OxPhos-Komplexe in der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut wird, katalysiert dieser Enzymkomplex ATP aus ADP und Phosphat. Um die Proteinmenge von Komplex V in 2-D BN/-SDS-Gelen zu quantifizieren, werden die Untereinheiten α (Spotnr. 02, 10, 12, 103), β (Spotnr. 03, 11, 13, 104), γ (Spotnr. 31, 33, 73, 74), b1 (Spotnr. 35b, 40) und OSCP (Spotnr. 39, 41, 116, 119) verwendet. Die für diese Auswertungen verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt.

In Abbildung 5.34 A sind die relativen Proteinmenge dieser Untereinheiten für das Monomer von BHM, DHM, PHM und WHM dargestellt. Wie erwartet zeigen die α - und β -Untereinheiten die höchsten Intensitäten. Bedingt durch den symmetrischen Aufbau der ATP-Synthase sind die Intensitäten bei beiden annähernd gleich sein. Für die Untereinheit γ sind die größten Unterschiede zu sehen. Im Vergleich zu BHM sind bei DHM, PHM und WHM die Proteinmengen deutlich höher (alle stat. sig.). Betrachtet man die Gesamtmenge an Monomer (Abbildung 5.34 B), so ist zu erkennen, dass PHM die mit Abstand höchste Proteinmenge besitzt (vs BHM: 33 %, stat. sig; vs WHM: 22%, stat. sig.). Bei BHM, PHM und WHM sind die Werte relativ ähnlich, im Bereich von 10 rel. GU zu finden.

Die Verteilung der Untereinheiten für das Dimer der ATP-Synthase sind in Abbildung 5.34 C gezeigt. Bedingt durch die großen Fehlerbalken (unterschiedlich starke Färbeintensität des Farbstoffes Sypro®Ruby bei den technischen Replikaten) bei BHM sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Besonders bei den Untereinheiten b1 und OSCP zeigt BHM im Vergleich mit DHM, PHM und WHM deutlich höhere Proteinmengen (alle stat. sig.). Die Summe aller Untereinheiten ist in Abbildung 5.34 D dargestellt. BHM besitzt tendenziell den höchsten Gehalt an Dimer, im Vergleich zu den anderen Proben liegt der Wert um 8 bis 26 % (stat. n. sig.) höher.

Im Gegensatz zum Monomer und Dimer konnte der Spot für die Untereinheit b1 des Trimers und Tetramers nicht mittels MS nachgewiesen werden. Daher werden im Folgenden nur die Daten der Untereinheiten α , β , γ und OSCP gezeigt.

In Abbildung 5.35 A sind die Spotintensitäten für das Trimer der ATP-Synthase dargestellt. Es ist zu erkennen, dass PHM und WHM eine deutlich niedrigere Proteinmenge an V_3 besitzen. Auch hier sind bedingt durch die großen Fehlerbalken bei den Untereinheiten α und β die Unterschiede statistisch nicht signifikant (im Mittel um 43 % bis 60 % niedriger). An diese Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass die ermittelten Graustufenwerte in einem niedrigeren Bereich liegen und dementsprechend kleine Unterschiede in der Färbeintensität der Replikate zu größeren Fehlerbalken führen. Bei der Untereinheit γ zeigt DHM eine um 106 % (stat. sig.) höhere Proteinmenge. Bei der Untereinheit OSCP stellen sich die Unterschiede in der Proteinmenge bezogen auf BHM wie folgt dar: DHM um 6 % (stat. sig)

höher, PHM um 49 % (stat. sig.) niedriger und WHM um 16 % niedriger (stat. n. sig.). Wie erwartet bestätigen die summierten Untereinheiten (Abbildung 5.35 B) diese Ergebnisse. BHM und PHM besitzen die höchsten Färbeintensitäten. Im Vergleich zu BHM ist die Proteinmenge bei PHM um 54 % (stat. sig.) und bei WHM um 35 % (stat. n. sig.) niedriger.

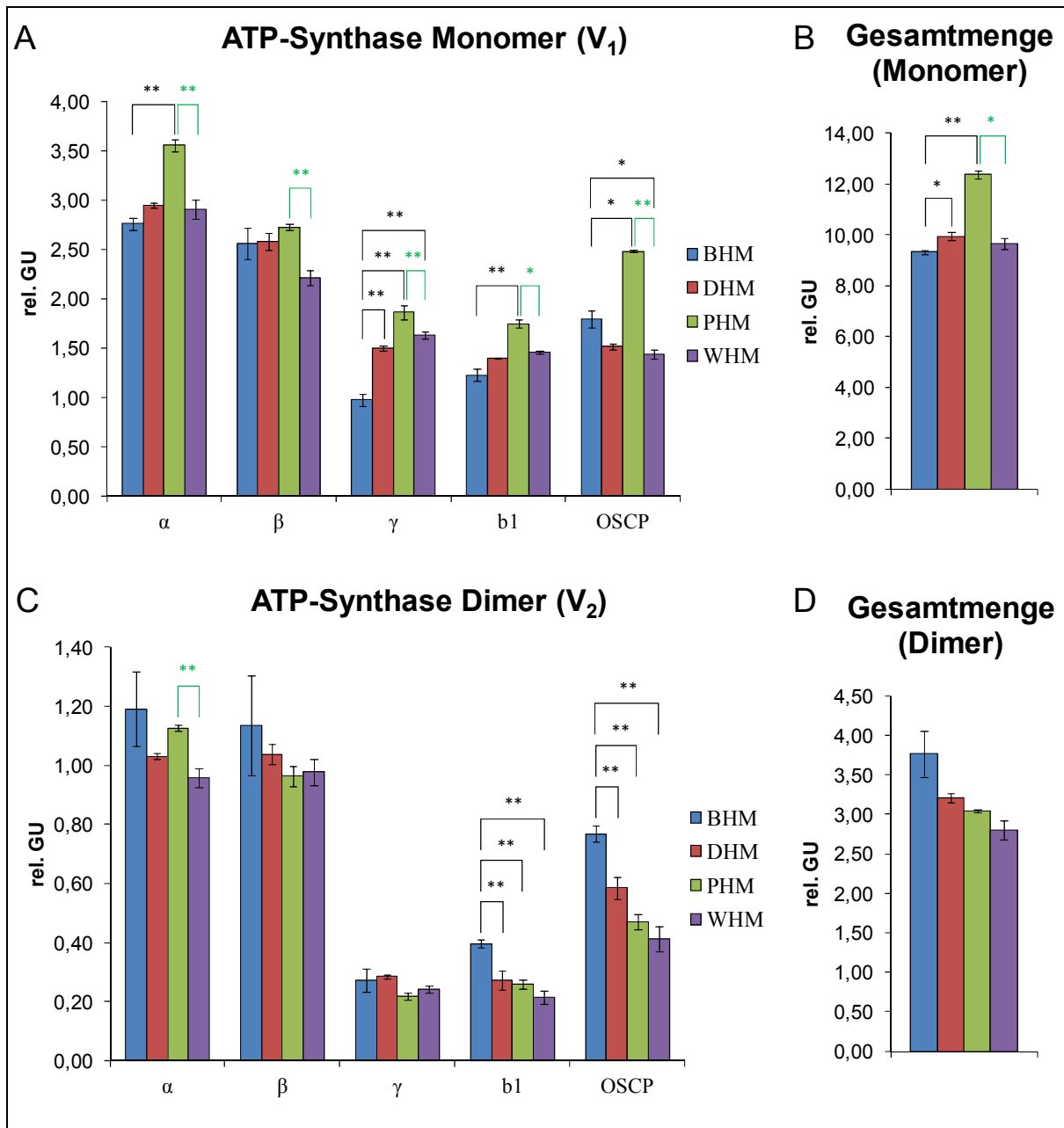


Abbildung 5.34: Proteinmengen der Untereinheiten für das Monomer und das Dimer der ATP-Synthase in 2-D BN/SDS-Gele von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A:** bzw. **C:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten von α , β , γ , b1 und OSCP für das Monomer bzw. Dimer. **B:** bzw. **D:** die Summe dieser Intensitäten. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM), grüne Sterne zeigen den Vergleich zwischen PHM und WHM.

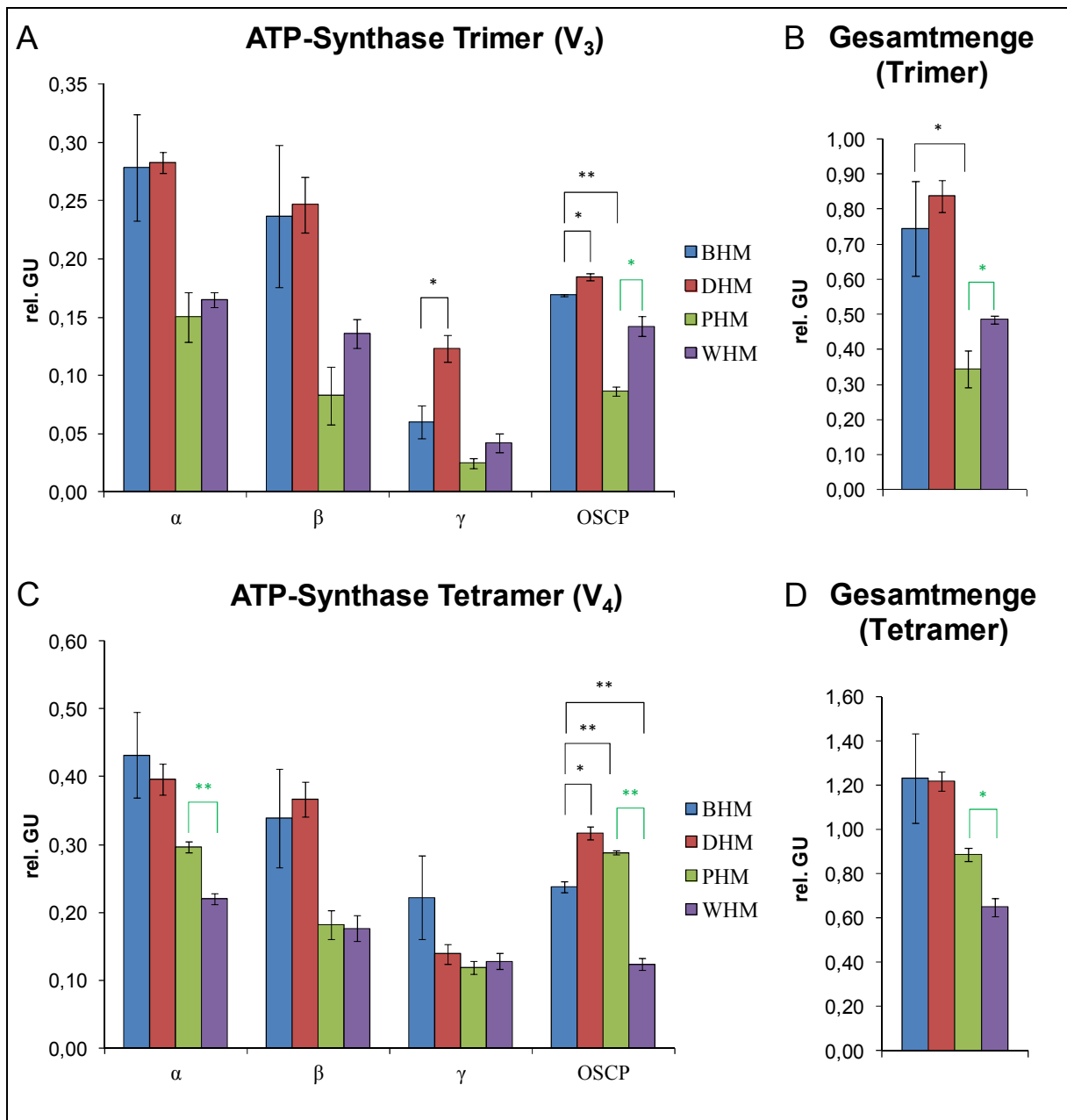


Abbildung 5.35: Proteinmengen der Untereinheiten für das Trimer und das Tetramer der ATP-Synthase der 2-D BN/SDS-Gele von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für die Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate ($n = 3$) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A:** bzw. **C:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten von α , β , γ , b1 und OSCP für das Trimer bzw. Tetramer. **B:** bzw. **D:** die Summe dieser Intensitäten. Weitere Angaben sind identisch mit **Abbildung 5.34**.

Die Proteinmengen der Untereinheiten für das Tetramer der ATP-Synthase sind in Abbildung 5.35 C gezeigt. Hier ist ein ähnlicher Trend wie bei dem Trimer zu beobachten, PHM und WHM zeigen im Vergleich zu BHM und DHM einen geringeren Wert. Für die Untereinheiten α und β ist dieser Unterschied etwas schwächer ausgeprägt (um 31 % bis 49 % niedriger, stat. n. sig.). Bei der Untereinheit γ besitzen bis auf BHM alle Proben relativ ähnliche Werte im Bereich um 0,13 rel. GU. Wie auch schon bei dem Dimer und Trimer zu erkennen, ergeben sich für die Untereinheit OSCP sehr viele Unterschiede in der Proteinmenge für die Proben. Bei DHM ist eine um 34 % größere, bei PHM um 21 % größere und bei WHM eine um 48 % niedrigere Proteinmenge ermittelt worden (alle stat. sig., Vgl. BHM). Ebenso zeigt ein Vergleich zwischen PHM und WHM einen Unterschied von 57 % (stat. sig.). In Abbildung 5.35 D ist Gesamtproteinmenge des Tetramers in relativen Graustufeneinheiten dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass BHM und DHM einen ähnlichen Wert im Bereich von 1,2 rel. GU besitzen. Im Vergleich dazu zeigen PHM eine um 47 % und WHM eine um 27 % niedrigere Intensität bezogen auf den Graustufenwert (beide stat. n. sig.).

Die Gesamtproteinmenge von Komplex V (Abbildung 5.36 B) zeigt für BHM, DHM und PHM keine großen Unterschiede. Bei WHM ist der Wert etwas niedriger, im Vergleich zu BHM um 10 % (stat. n. sig.) bzw. zu PHM um 17 % (stat. sig.).

In Abbildung 5.36 A ist eine Verteilung der ATP-Synthase als V_1 , V_2 , V_3 und V_4 gezeigt. Die hier dargestellten prozentualen Werte beziehen sich auf die Verhältnisse der relativen Graustufenwerte aus den vorher gezeigten Daten. Da für das Trimer und Tetramer die Untereinheit b1 nicht in die Auswertung einbezogen werden konnte, wurden für dieses Diagramm nur die Untereinheiten α , β , γ und OSCP berücksichtigt. Die ATP-Synthase liegt hauptsächlich in ihrer monomeren Form vor. Bei BHM ist dies vergleichsweise der geringste Anteil mit 61 % und bei DHM der höchste Anteil mit 74 %. Auf das Dimer entfallen zwischen 18 und 24 %, auf das Trimer 2 bis 7 % und auf das Tetramer 6 bis 9 %. Auffällig ist hierbei, dass der Anteil an Trimeren höher ist als an Tetrameren. Dies könnte verschiedene Ursachen haben, unterschiedliche Stabilitäten der Homooligomere, synergistische bzw. strukturelle Vorteile, wenn 2 Dimere miteinander verbunden sind.

Untersuchungen von Buzhynskyy *et al.*^[202] an ATP-Synthasen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mittels Rasterkraftelektronenmikroskopie deuten darauf hin, dass es sich bei höheren Oligomeren um Reihen aus Komplex V Dimeren handelt. Ähnliche Erkenntnisse wurden auch von Dudkina *et al.*^[203] für die Alge *Polytomella* und von Kühlbrandt *et al.*^[7] für *Podospira anserina* erhalten.

Das Verhältnis Monomer zu Dimer ist in Abbildung 5.36 C dargestellt. Ein Wert von 2 würde beispielsweise bedeuten, dass die Menge an Monomeren doppelt so groß ist wie bei den Dimeren. Es ist zu erkennen, dass bei BHM der Wert (2,50 rel. GU.) am niedrigsten ist und damit die Menge an Dimer verhältnismäßig am höchsten. Besonders bei PHM ist das Verhältnis deutlich stärker zu der monomeren Form verschoben, im Vergleich zu BHM entspricht dies einem Unterschied von 63 % (stat. sig.).

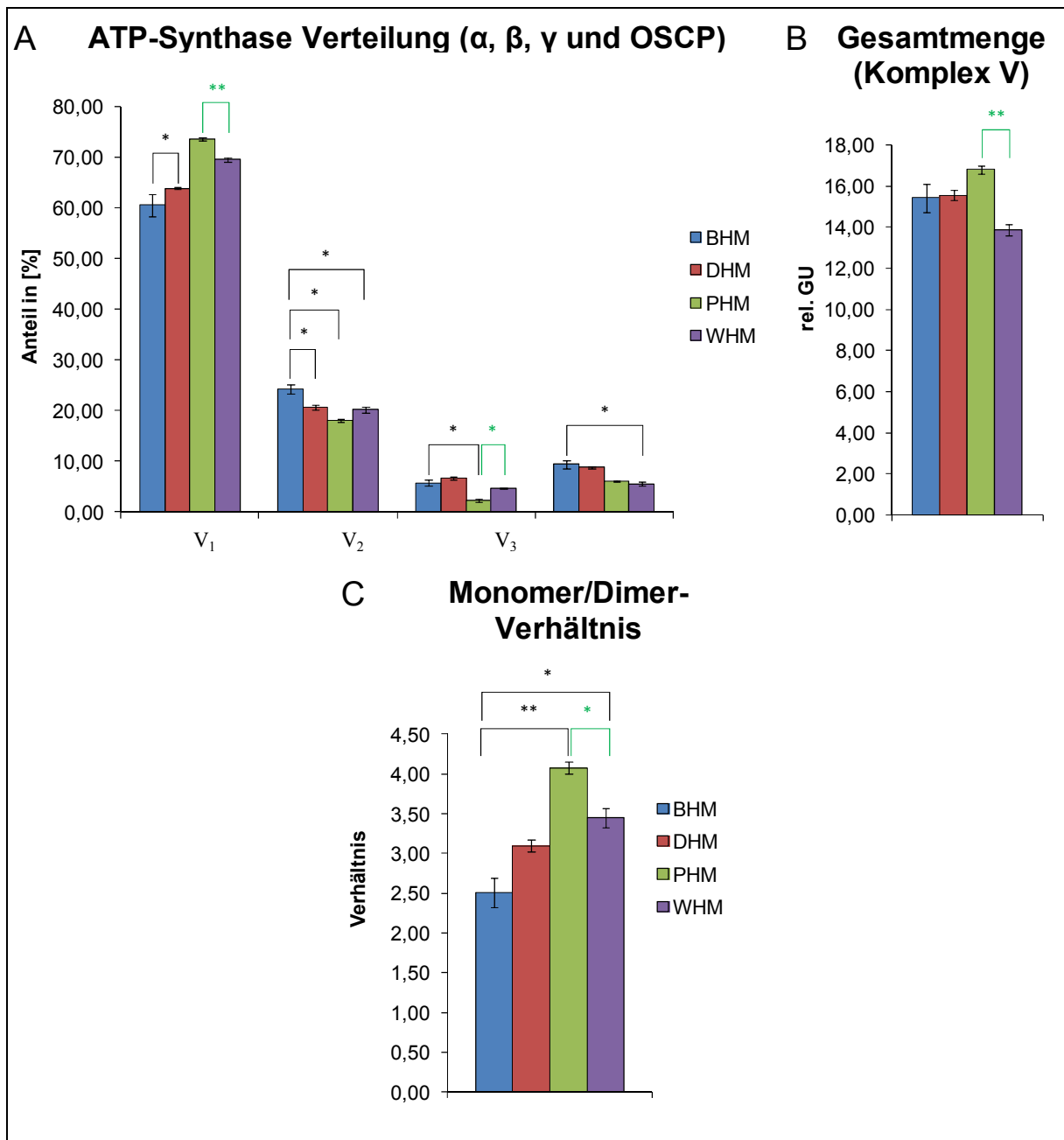


Abbildung 5.36: prozentuale Verteilung der ATP-Synthase (α , β , γ , OSCP) als Monomer V_1 , Dimer V_2 , Trimer V_3 und Tetramer V_4 (A), Gesamtproteinmenge von Komplex V (B) und Monomer/Dimer-Verhältnis (C) von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für die Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate ($n = 3$) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. Weitere Angaben sind identisch mit **Abbildung 5.34**.

5.1.5.2.2 Komplex I

Die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) ist der erste und mit ca. 45 Untereinheiten auch der größte Enzymkomplex der mitochondrialen Atmungskette (Molekularmasse 1 MDa). Komplex I oxidiert NADH und überträgt diese Elektronen auf Ubichinon (Coenzym Q). Hierbei kommt es zur Translokation von 4 Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum, wodurch der in Abschnitt 5.1.5.2.1 beschriebene elektrochemische Protonengradient etabliert wird. Der Mechanismus dieser Redoxreaktion gekoppelt mit dem Pumpen von Protonen ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt^[204]. Für die Quantifizierung der Proteinspots von Komplex I werden die Untereinheiten NDUS1 (Spotnr. 04, 05, 99), NDUS2 (Spotnr. 14, 15) und NDUA9 (Spotnr. 25, 26) verwendet. Da für den individuellen Komplex I nicht bei allen Proben Untereinheiten identifiziert werden konnten, werden nur die Proteinspots für Komplex I in den Superkomplexen I₁III₂ (a), I₁III₂IV₁ (b) und I₁III₂IV₁ (c) untersucht. Die für diese Auswertungen verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt.

In Abbildung 5.37 A sind die relativen Proteinmengen dieser Untereinheiten für den Superkomplex a von BHM, DHM, PHM und WHM gezeigt. BHM und DHM zeigen bei allen Untereinheiten einen ähnlichen Graustufenwert. Im Gegensatz dazu ist bei PHM und WHM die Proteinmenge für alle Untereinheiten niedriger. Für die Untereinheit NDUS1 bedeutet dies im Mittel eine Verringerung der Proteinmenge um 56 % (stat. n. sig), für NDUS2 um 18 % (für PHM stat. sig.) und für NDUA9 um 22 % (stat. sig.). Betrachtet man die summierten Intensitäten dieser Proteinspots, gezeigt in Abbildung 5.37 B, so ist zu erkennen, dass der Anteil von Superkomplex a an der Gesamtproteinmenge bei PHM im Vergleich zu BHM um 37 % (stat. sig.) niedriger ist. Für WHM ergibt sich ein um 17 % (stat. n. sig.) niedrigerer Anteil. Vergleicht man die Ergebnisse von Schwein und Wildschwein, die zur gleichen Gattung gehören, erhält man für WHM eine um 32 % (stat. sig.) größere Proteinmenge.

In Abbildung 5.37 C ist zu erkennen, dass DHM und PHM die vergleichsweise höchsten Intensitäten für die Proteinspots NDUS1 und NDUS2 in Superkomplex b aufweisen. Im Vergleich zu BHM bedeutet dies für DHM eine um 46 % (Mittelwert, bei beiden stat. sig.) höhere und für PHM eine um 26 % höhere Proteinmenge (für NDUS1 stat. sig.). Für die Untereinheit NDUA9 besitzen BHM, DHM und PHM ähnliche Werte, WHM besitzt mit 0,73 rel. GU einen etwas niedrigeren Wert. Die Gesamtproteinmenge von Komplex I in Superkomplex b bestätigt den beobachteten Trend, DHM zeigt den höchsten Graustufenwert gefolgt von PHM (23 % bzw. 15 % größer, im Vergleich zu BHM, stat. n. sig.).

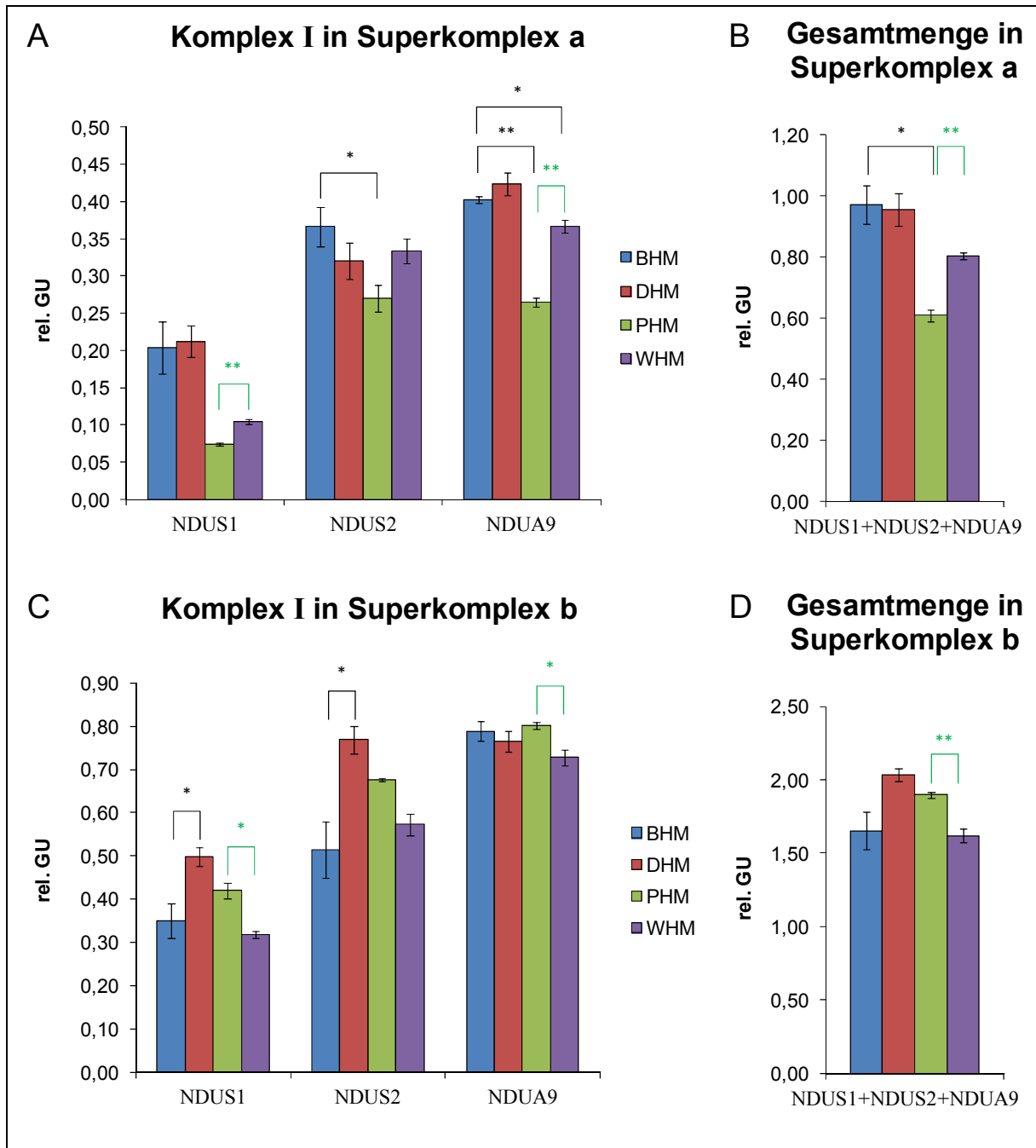


Abbildung 5.37: Proteinmengen der Untereinheiten für Komplex I in Superkomplex a und b in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A:** bzw. **C:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten NDUS1, NDUS2 und NDUA9 in den Superkomplexen a und b. **B:** bzw. **D:** die Summe dieser Intensitäten. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM), grüne Sterne zeigen den Vergleich zwischen PHM und WHM.

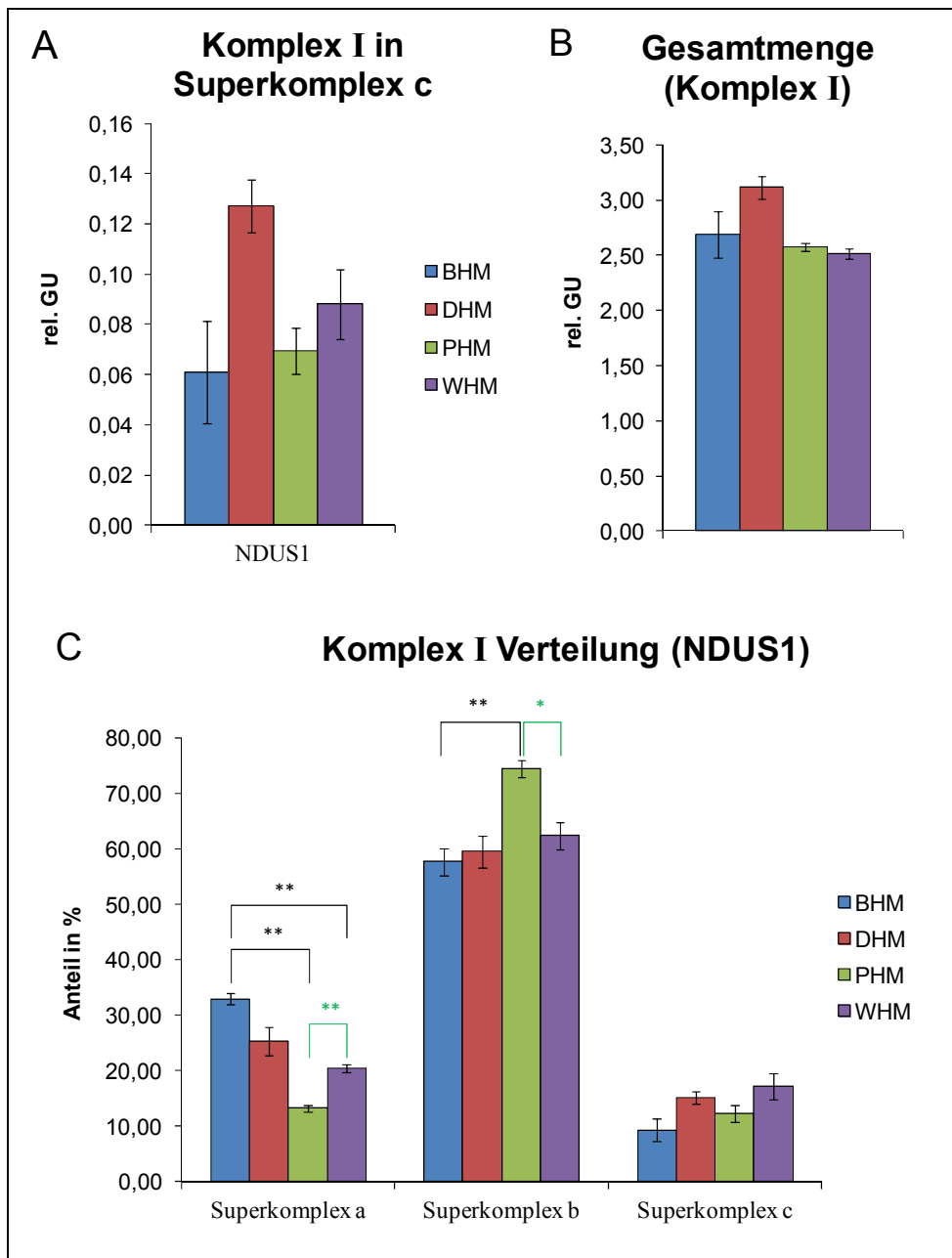


Abbildung 5.38: Proteinmengen von NDUS1 für Komplex I in Superkomplex c (A), die Gesamtproteinmenge von Komplex I (B) und die prozentuale Verteilung der Untereinheit NDUS1 auf die Superkomplexe a, b und c (C) von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. Weitere Angaben sind identisch mit **Abbildung 5.37**.

Für die Untersuchung der Proteinmenge von Komplex I in Superkomplex c (Abbildung 5.38 A) wird nur die Untereinheit NDUS1 ausgewertet. Eine Ursache ist darin zu finden, dass die Untereinheiten NDUS2 und NDUA9 nicht mittels PMF bzw. Western Blots nachgewiesen werden konnten. Ebenso konnten die Proteinspots in der Software Delta 2D nicht eindeutig auf den 2-D BN/SDS Gelen zugeordnet werden. Ähnlich wie bei Superkomplex b besitzt DHM im Vergleich zu BHM eine große Proteinmenge. Dieser Unterschied ist bei Superkomplex c deutlich stärker ausgeprägt (109 %, stat. n. sig.). WHM zeigt einen etwas höheren Gehalt (35 %, stat. n. sig.), ebenso PHM (14 %, stat. n. sig.).

In Abbildung 5.38 B sind die summierten Gesamtproteinmengen von Komplex I in den Superkomplexen a, b und c dargestellt. Hierbei treten keine signifikanten Unterschiede bei allen Organismen auf. Im Vergleich zu BHM ist bei DHM der Graustufenwert um 16 % höher, bei PHM um 4 % und bei WHM um 7 % niedriger.

Für die prozentuale Verteilung von Komplex I wurde ebenfalls nur die Untereinheit NDUS1 in die Auswertung einbezogen (Abbildung 5.38 C). Bereits bei der qualitativen Auswertung des BN-Gels von BHM, DHM, PHM und WHM (Abschnitt 5.1.2.1) konnte gezeigt werden, dass Superkomplex b den größten Anteil an den Superkomplexen a bis d besitzt. Die Ergebnisse aus der quantitativen Analyse von Komplex I in 2-D BN/SD-Gelen bestätigen dies. Bei PHM ist dies am stärksten ausgeprägt, dort liegt der Anteil an Superkomplex b bei 74 %. Für BHM, DHM und WHM werden Werte in einem Bereich zwischen 58 und 62 % gefunden. Interessanterweise treten ähnlich wie bei den Ergebnissen für Komplex V deutliche Unterschiede zwischen den Atmungskettenkomplexen aus Schwein und Wildschwein zu auf.

5.1.5.2.3 Komplex III

Die Q-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (Komplex III) liegt als integrales Membranprotein nur als Dimer in den Mitochondrien von Tieren und Pflanzen vor. Es ist aus 10 Untereinheiten aufgebaut und besitzt in dimerer Form eine Molekularmasse von 500 kDa. Es katalysiert die Übertragung von Elektronen von dem Coenzym Q auf das wasserlösliche Cytochrom *c*. Ebenso wie bei Komplex I werden bei diesem Vorgang Protonen von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt^[205]. Da es sich Vergleich zu Komplex I um einen kleineren Enzymkomplex handelt, existieren bereits zahlreiche strukturelle Informationen des intakten nativen Komplexes in verschiedenen Organismen. Schägger *et al.*^[206] haben Komplex III aus Rind und Mensch, Zhang *et al.*^[207] aus Hase und Huhn charakterisiert.

Für die Quantifizierung der Proteinspots von Komplex III werden die Untereinheiten QCR2 (Spotnr. 16, 17, 23), QCR7 (114, 108, 108b) und UCRI (Spotnr. 36, 95, 98) verwendet. Hier sei wiederum auf Gomez *et al.*^[177] verwiesen, der für die Superkomplexe a, b, c und d die Untereinheiten QCR2 und UCRI identifizieren konnte. Im Folgenden werden die Ergebnisse für den individuellen Komplex III₂ und die Superkomplexe a und b gezeigt (Abbildungen 5.39 und 5.40). Für Superkomplex c konnten mittels PMF keine Untereinheiten nachgewiesen werden. Ebenso war keine eindeutige Zuordnung der Untereinheit QCR2 mittels 2-D Western Blot möglich, da die Spots im Bereich der Superkomplexe zu diffus waren.

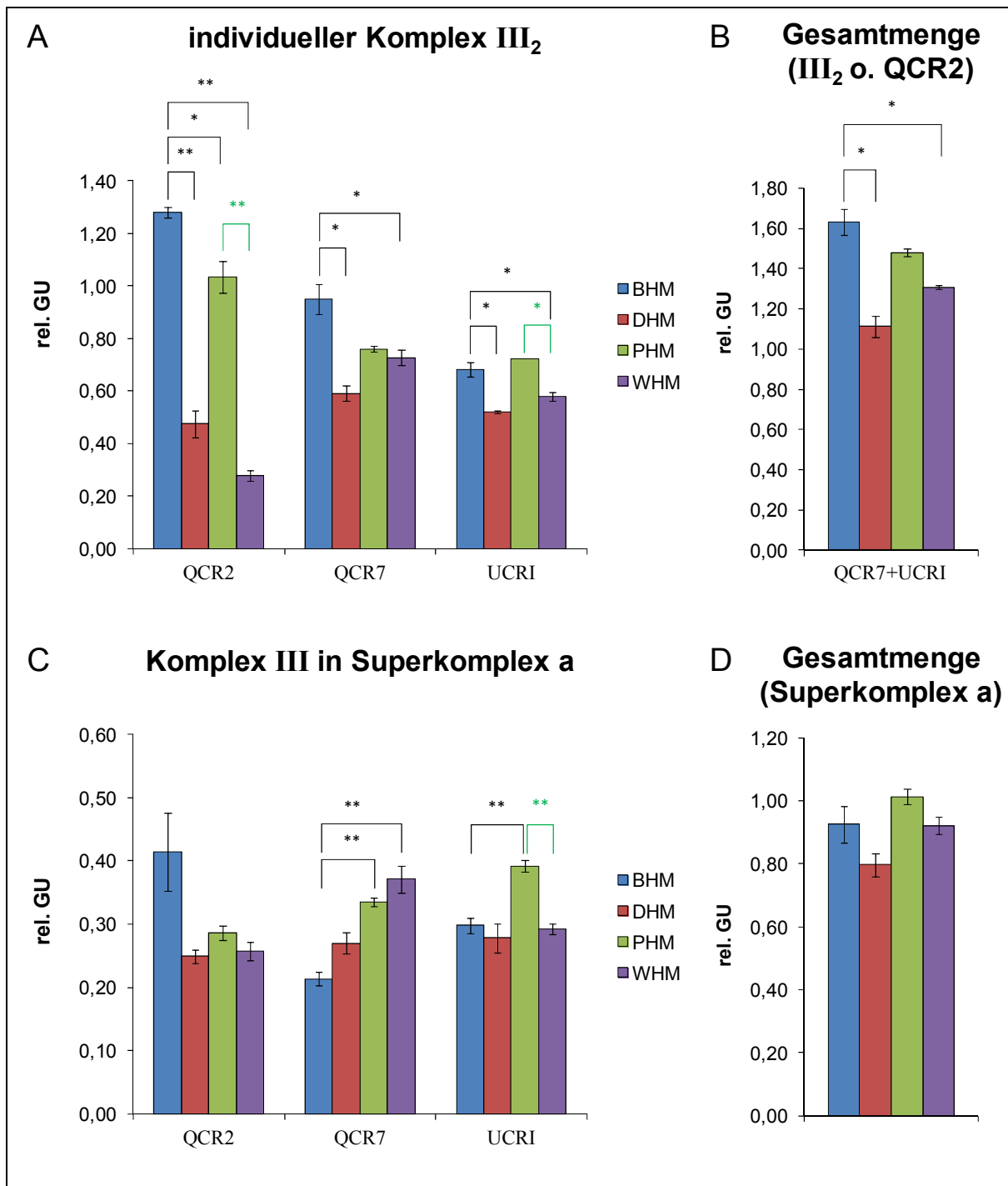


Abbildung 5.39: Proteinmengen der Untereinheiten für Komplex III in der individuellen Form (Dimer) und Superkomplex a in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A:** bzw. **C:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten QCR2, QCR7 und UCRI in dem Dimer und Superkomplexen a. **B:** bzw. **D:** die Summe dieser Intensitäten. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM), grüne Sterne zeigen den Vergleich zwischen PHM und WHM.

Anhand der Proteinengen dieser Untereinheiten für den individuellen Komplex III₂ (Abbildung 5.39 A) ist zu erkennen, dass BHM eine etwas höhere Proteinmenge im Vergleich zu den anderen untersuchten Proben besitzt. Für die Untereinheit QCR2 ergibt sich bei DHM ein um 63 %, bei PHM eine um 19 % und bei WHM eine um 78 % (alle stat. sig.) niedrigere Proteinmenge. Diese Ergebnisse müssen allerdings kritisch betrachtet werden. Unter der Annahme, dass der strukturelle Aufbau des individuellen Komplexes III₂ in den verschiedenen Organismen sehr ähnlich ist, müssten auch die Verhältnisse der Untereinheiten untereinander ähnlich sein. Diese Verhältnisse sind für BHM und PHM bzw. DHM und WHM deutlich verschieden. Als Ursache können entweder die Grenzen der Proteinspots auf den Fusionsgelen für BHM und PHM nicht richtig gesetzt worden sein oder es kann sich um eine Überlagerung von 2 Proteinspots an dieser Stellen handeln, die bei der Ermittlung des Graustufenwertes von Delta 2D nicht ordnungsgemäß getrennt werden können. Daher werden für die folgenden Diagramme die Werte von QCR2 des individuellen Komplexes nicht berücksichtigt. Für die Untereinheiten QCR7 und UCRI besitzt BHM ebenfalls den höchsten Wert, im Vergleich zu DHM und WHM in beiden Fällen signifikant.

In Abbildung 5.39 B ist die Proteinmenge der summierten Untereinheiten QCR7 und UCRI für den individuellen Komplex III₂ dargestellt. Die zuvor beschriebenen Trends sind auch hier zu erkennen.

Die Intensitäten der Graustufenwerte der Proteinspots für Komplex III in Superkomplex a sind in Abbildung 5.39 C gezeigt. Für QCR2 sind bedingt durch den großen Fehlerbalken bei BHM keine signifikanten Unterschiede zu sehen. Für QCR7 besitzen WHM und PHM im Vergleich zu BHM die höchsten Werte (74 % bzw. 57 %, beide stat. sig.). Ebenso ist für die Untereinheit UCRI bei PHM ein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge (Vgl. BHM 31 % bzw. Vgl. WHM 25 %) zu erkennen. Bei der Gesamtproteinmenge für Superkomplex a (Abbildung 5.39 D) gleichen sich die beobachteten Unterschiede der Proben wieder aus, nur DHM zeigt einen etwas niedrigeren Wert (14%, Vgl. BHM).

Für Superkomplex b (Abbildung 5.40 A und B) ist zu erkennen, dass DHM die größte Proteinmenge besitzt (43 %, Vgl. BHM, stat. sig.). Ähnliche Ergebnisse finden sich auch bei den Untereinheiten QCR2 und UCRI (beide stat. sig.). Des Weiteren ist auch bei einem Vergleich der Ergebnisse für Schwein und Wildschwein zu sehen, dass WHM eine signifikant höhere Proteinmenge als PHM aufweist.

Um die Anteile von Komplex III an dem individuellen Komplex III₂ und den Superkomplexen a und b (Abbildung 5.40 C) darzustellen, wurden ebenfalls nur die Daten für die Untereinheiten QCR7 und UCRI verwendet. Während bei BHM und PHM der Hauptanteil in dimerer Form vorliegt (50 bzw. 45 %), ist bei DHM und WHM der größte Teil in Superkomplex b zu finden (49 bzw. 43 %). Der Anteil an Superkomplex a bei allen Proben ähnlich stark in einem Bereich von 16 bis 21 % ausgeprägt.

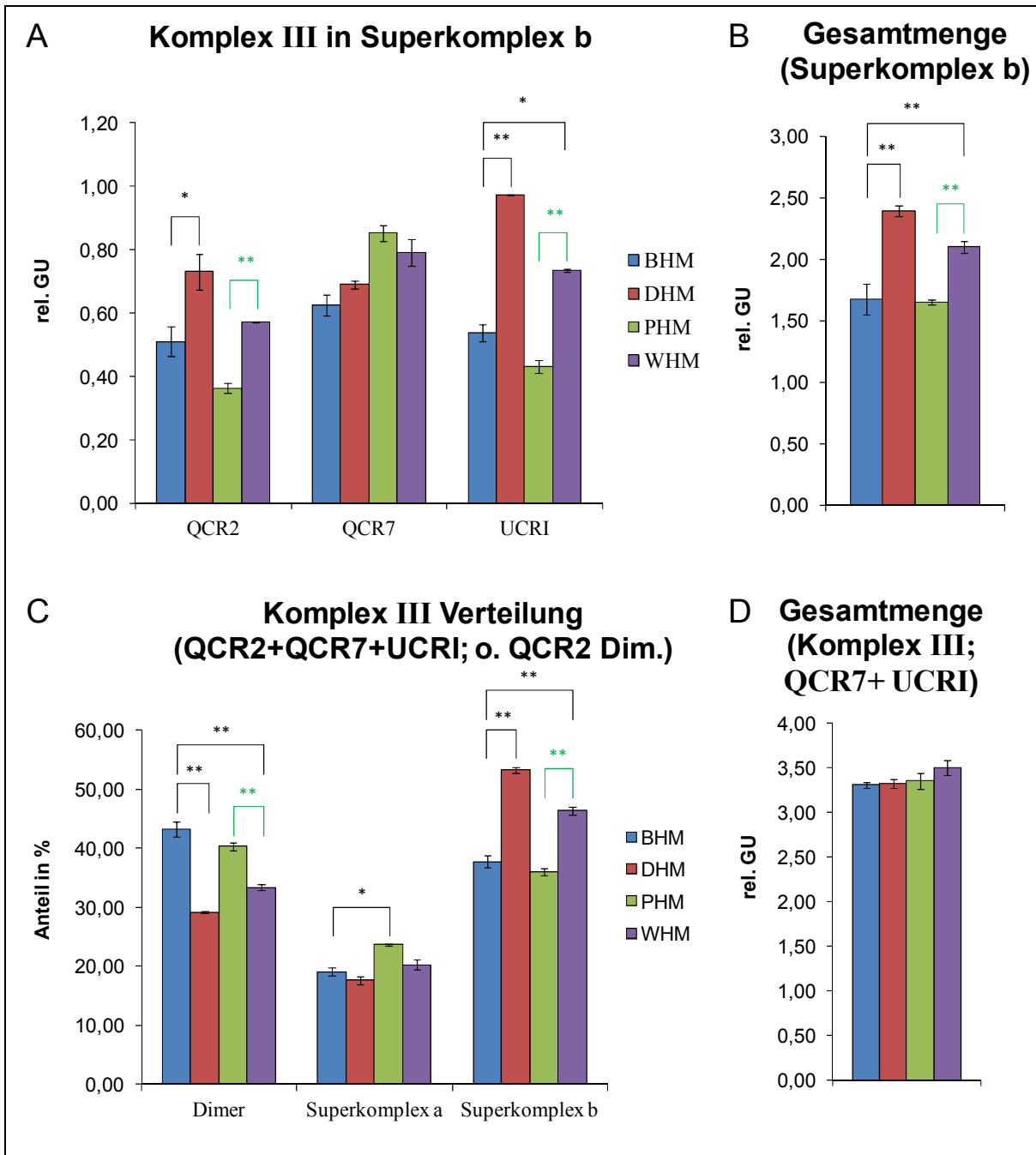


Abbildung 5.40: Proteinmengen der Untereinheiten für Komplex III in Superkomplex b und die prozentuale Verteilung für Komplex III von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten QCR2, QCR7 und UCRI in Superkomplex b. **B:** die Summe dieser Intensitäten. **C:** die prozentuale Verteilung der Proteinmengen auf den individuellen Komplex III und die Superkomplexe a und b (ohne QCR2 vom Dimer). **D:** die Gesamtproteinmenge von Komplex III. Weitere Angaben sind identisch mit **Abbildung 5.39**.

Bei Betrachtung der Proteingesamtmenen von Komplex I und V (Abschnitt 5.1.5.2.1 und .2) war bereits zu sehen, dass für die verschiedenen Proben die Werte sehr ähnlich sind. Auch für Komplex III bestätigt sich diese Beobachtung (Abbildung 5.40 D). Obwohl es sich hierbei um unterschiedliche Organismen handelt, ist die relative Proteinmenge dieser Atmungskettenkomplexe (bezogen auf die Gesamtproteinmenge auf dem 2-D Gel) sehr ähnlich. Ebenso liegen die Verhältnisse von Superkomplexen zu individuellem Komplex in einem ähnlichen Bereich. Könnte es sich hierbei um ein übergeordnetes Funktionsprinzip handeln, dass in vielen Mitochondrien von Säugetieren zu finden ist?

5.1.5.2.4 Komplex IV

Die Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV) ist aus 13 Untereinheiten aufgebaut und besitzt eine Molekularmasse von 200 kDa^[22]. Es katalysiert die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser unter gleichzeitiger Oxidation von Cytochrom *c*. Ebenso wie bei Komplex I und III handelt es sich bei diesem Enzymkomplex um eine Protonenpumpe, die während dieser Katalyse vier Protonen aus der mitochondrialen Matrix für die Synthese von Wasser und darüber hinaus vier Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transloziert^[22]. Die Kristallstrukturen von Komplex IV aus Rinderherzmitochondrien^[135, 208, 209] deuten darauf hin, dass es ähnlich wie Komplex III in dimerer Form vorliegt. Sowohl bei Wittig *et al.*^[137] als auch in dieser Arbeit (Abschnitt 5.1.2, 5.1.3) konnte gezeigt werden, dass bei Solubilisierung von Mitochondrien mit Digitonin Komplex IV sowohl Monomere und Dimere als auch höhere Oligomere gefunden werden. Alle besitzen in den oben beschriebenen In-Gel Aktivitätstests (Abschnitt 5.1.2) auch eine enzymatische Aktivität.

Da auf den 2-D BN/SDS-Gelen nur Untereinheiten von IV₁, IV₂ und III₂IV₁ nachgewiesen werden konnten, werden die Ergebnisse für diese Proteinspots vorgestellt. Für den individuellen Komplex IV₁ wurden die Untereinheiten COX1, COX2, COX41, COX5a COX6B1 (Spotnr. 47, 50, 53, 54, 54a), für das Dimer IV₂ bzw. für den Superkomplex III₂IV₁ nur die Untereinheit COX1 (Spotnr. 30, 29) verwendet. Im Bereich der Superkomplexe konnte mittels 2-D Western Blots zwar die Untereinheit COX1 nachgewiesen werden, allerdings war keine eindeutige Zuordnung zu einem der Superkomplexe möglich.

In Abbildung 5.41 A sind die Intensitäten der Untereinheiten für den individuellen Komplex IV₁ dargestellt. Es ist zu erkennen, dass PHM und DHM im Vergleich zu BHM eine deutlich höhere Proteinmengen aufweisen, bei Untereinheit COX1 eine um 78 bzw. 45 % (beide stat. sig.), bei COX2 um 149 bzw. 107 % (beide stat. sig.), bei COX41 um 47 bzw. 24 % (nur bei DHM stat. sig.), bei COX5A um 61 bzw. 3 % (nur bei DHM stat. sig.) und bei COX6B1 eine um 84 bzw. 83 % (beide stat. sig.) höhere Proteinmenge. Bei einem Vergleich zwischen den Proben aus Schwein und Wildschwein ist zu sehen, dass es signifikante Unterschiede gibt (im Mittel 30 %, für alle Untereinheiten stat. sig.). Die Summe der Intensitäten aller Untereinheit ist in Abbildung 5.41 B gezeigt. PHM besitzt den höchsten Graustufenwert, gefolgt von DHM (beide stat. sig.). WHM zeigt mit 8,4 rel. GU einen deutlich niedrigeren Wert im Vergleich zu PHM (stat. sig.)

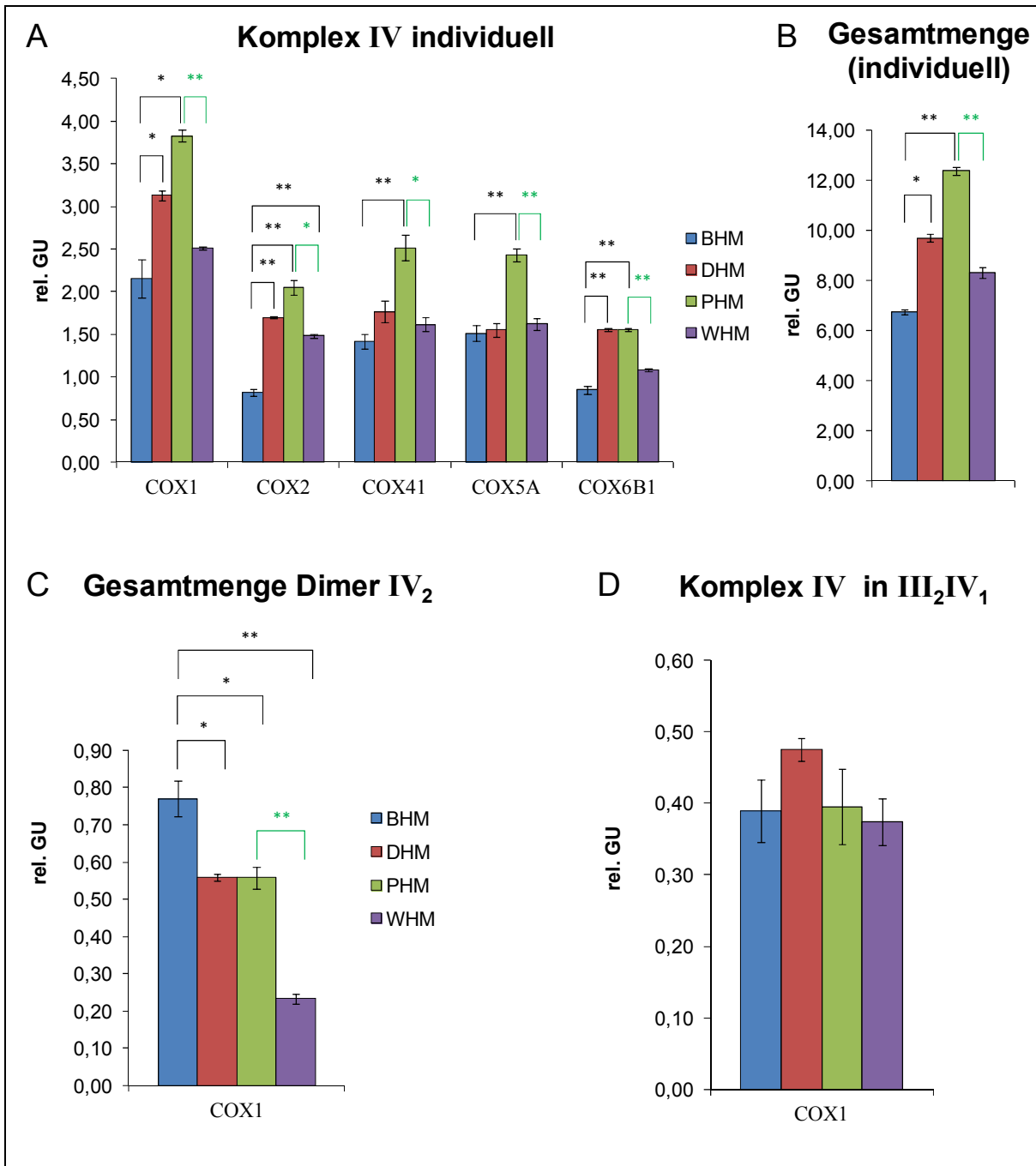


Abbildung 5.41: Proteinmengen der Untereinheiten für den individuellen Komplex IV₁, das Dimer IV₂ und den Superkomplex III₂IV₁ in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A:** Die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten COX1, COX2, COX4I, COX5I und COX6B1 für den individuellen Komplex IV₁. **B:** Die Summe dieser Intensitäten. **C:** bzw. **D:** Intensität von COX1 für das Dimer IV₂ bzw. den Superkomplex III₂IV₁. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM), grüne Sterne zeigen den Vergleich zwischen PHM und WHM.

Bei der dimeren Form von Komplex IV (Abbildung 5.41 C) zeigt BHM die höchste Proteinmenge (stat. sig. im Vergleich zu allen anderen Proben) und WHM die niedrigste Proteinmenge (Vgl. BHM: 70 %, Vgl. PHM: 58 %, stat. sig.). Diese Ergebnisse beziehen sich wie bereits vorher erwähnt nur auf die mitochondrial codierende Untereinheit COX1.

Trotz seiner geringeren Masse (700 kDa) ist die Bande für den Superkomplex III₂IV₁ auch bei den hier untersuchten Proben oberhalb des Monomers der ATP-Synthase (750 kDa) zu finden (BN-PAGE, siehe Abschnitt 5.1.2.1). Dieser Superkomplex konnte in Mitochondrien aus Rinderherz^[63, 150] und Mausfibroblasten^[171] nachgewiesen werden. Bei dem Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* konnte von Cruciat *et al.*^[210] sogar gezeigt werden, dass auch höhere Formen wie beispielsweise III₂IV₂ in den Mitochondrien zu finden sind. Die Proteinmenge von Komplex IV an dem Superkomplex III₂IV₁ zeigt für alle Probe keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 5.41 D). DHM zeigt tendenziell eine etwas größere Proteinmenge, im Vergleich zu BHM um 23 %. Ein Grund für die großen Fehlerbalken liegt darin, dass die Untereinheiten von Superkomplex III₂IV₁ sehr nahe bei dem Monomer von Komplex V zu finden sind. Dies erschwert stellenweise die eindeutige Zuordnung der Untereinheit COX1 mit der Software Delta 2D. Dementsprechend gibt es bei den technischen Replikaten teilweise deutlich größere Unterschiede bei den ermittelten Werten als bei den Untereinheiten für IV₁ und IV₂.

Die prozentuale Verteilung von Komplex IV auf den individuellen Komplex IV₁, das Dimer IV₂ und den Superkomplex III₂IV₁ ist in Abbildung 5.42 A dargestellt. Da für IV₂ und III₂IV₁ nur COX1 nachgewiesen werden konnte, wird auch diese Darstellung nur auf diese Untereinheit bezogen. Bei BHM, DHM, PHM und DHM ist zu sehen, dass der Hauptteil von Komplex IV in individueller Form vorliegt (65 bis 80 %). Interessanterweise ist für BHM der Anteil an dem Dimer IV₂ im Vergleich zu allen anderen Proben um mindestens 10 % größer. Für den Superkomplex III₂IV₁ bewegen sich alle Werte in einem ähnlichen Bereich zwischen 8 und 11 %. Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse, die bereits im Abschnitt 5.1.2.1 gezeigt wurden. Anhand des Coomassie gefärbten Gels in Abbildung 5.1 A war zu erkennen, dass die Bande für den individuellen Komplex IV₁ eine hohe Intensität besitzt. Des Weiteren zeigte auch der Komplex-IV-Aktivitätstest, dass der individuelle Komplex im Vergleich zu den anderen Banden die stärkste Präzipitatbildung aufweist.

Da für Berechnung der Gesamtproteinmenge von Komplex IV die Intensitäten aller Untereinheiten verwendet werden und, wie eben gezeigt, der individuelle Form von Komplex IV den Großteil der Proteinmenge darstellt, sind die Diagramme in Abbildung 5.42 B und Abbildung 5.41 B sehr ähnlich. PHM besitzt im Vergleich zu BHM den höchsten Wert (stat. sig.), gefolgt von DHM (stat. sig.).

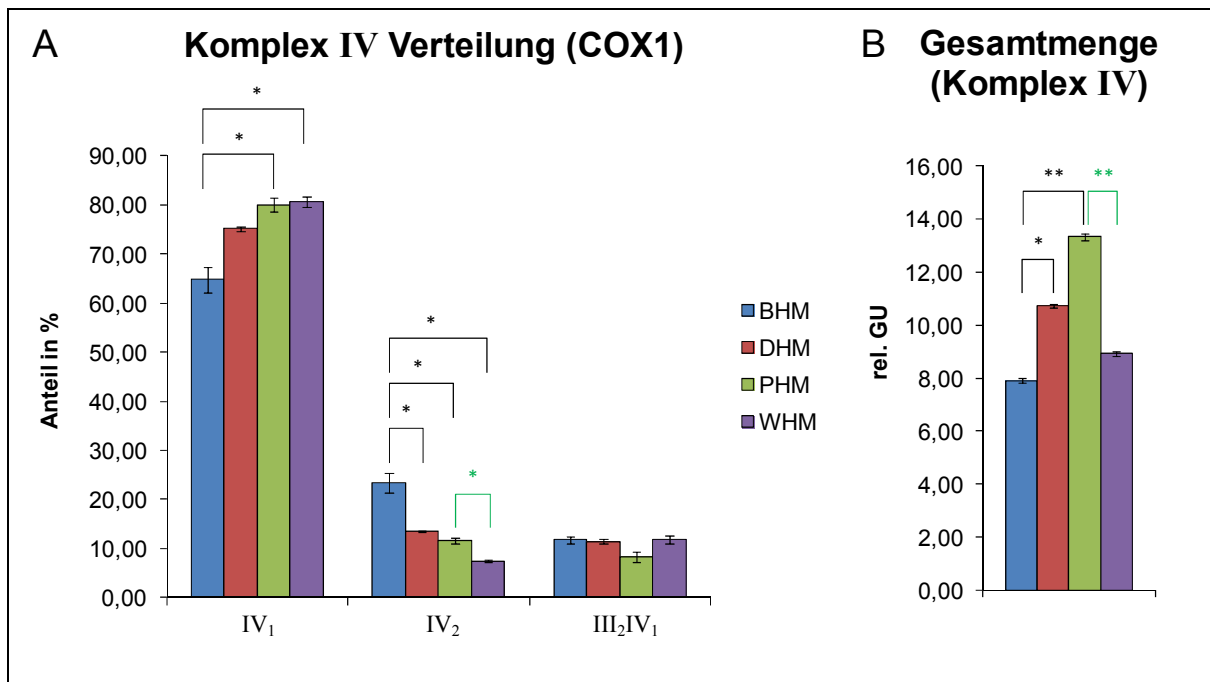


Abbildung 5.42: prozentuale Verteilung für die Untereinheit COX1 (A) bzw. Gesamtproteinmenge (B) für Komplex IV von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. Weitere Angaben sind identisch mit **Abbildung 5.41**.

5.1.5.2.5 Nicht-OxPhos-Proteine

Im Folgenden werden die Ergebnisse von Proteinen vorgestellt, die zwar nicht zu der mitochondrialen Atmungskette gehören, jedoch entscheidend für andere Stoffwechselvorgänge innerhalb des Mitochondriums sind.

Hitzeschockproteine sind ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert und sind für korrekte Faltung in der mitochondrialen Matrix verantwortlich^[188]. Chen *et al.*^[211] haben herausgefunden, dass geringe Mengen des Proteins in der Matrix bereits vorhanden sein müssen, damit weitere Kopien des gleichen Proteins hergestellt werden können. In Abbildung 5.43 A sind die Proteinmengen für das Hitzeschockprotein HSP60 gezeigt. PHM und WHM zeigen im Vergleich zu BHM den höchsten Anteil an HSP60 (um 98 % größer, beide stat. sig.). Die Werte liegen für beide Proben in einem ähnlichen Bereich.

Viele Proteine, die an der β -Oxidation von Fettsäuren mitwirken, sind Teil eines Multienzymkomplexes, der als mitochondriales Trifunktionales Enzym bezeichnet wird^[191]. Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den Proteinmengen von BHM, DHM, PHM und WHM zu erkennen (Abbildung 5.43 B), bei allen Proben liegen die Werte in einem ähnlichen Bereich.

Für den Citratzyklus wurden Proteinspots für die Aconitase (ACON), die Citrat-Synthase (CISY) und die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLDH) in den 2-D Gelen quantifiziert. Für PHM konnte der Spot für CISY nicht auf den Sypro[®] Ruby-gefärbten Gelen zugeordnet

werden. In Abbildung 5.43 C ist zu erkennen, dass WHM bei diesen Proteinen den höchsten Wert besitzt. Für die Aconitase entspricht dies in Vergleich zu BHM einem Unterschied von 212 % (stat. sig.), für die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase von 28 % (stat. n. sig.) und für die Citrat-Synthase von 97 % (stat. sig.). Des Weiteren zeigt auch PHM für die Aconitase eine um 96 % höhere Proteinmenge (stat. sig.).

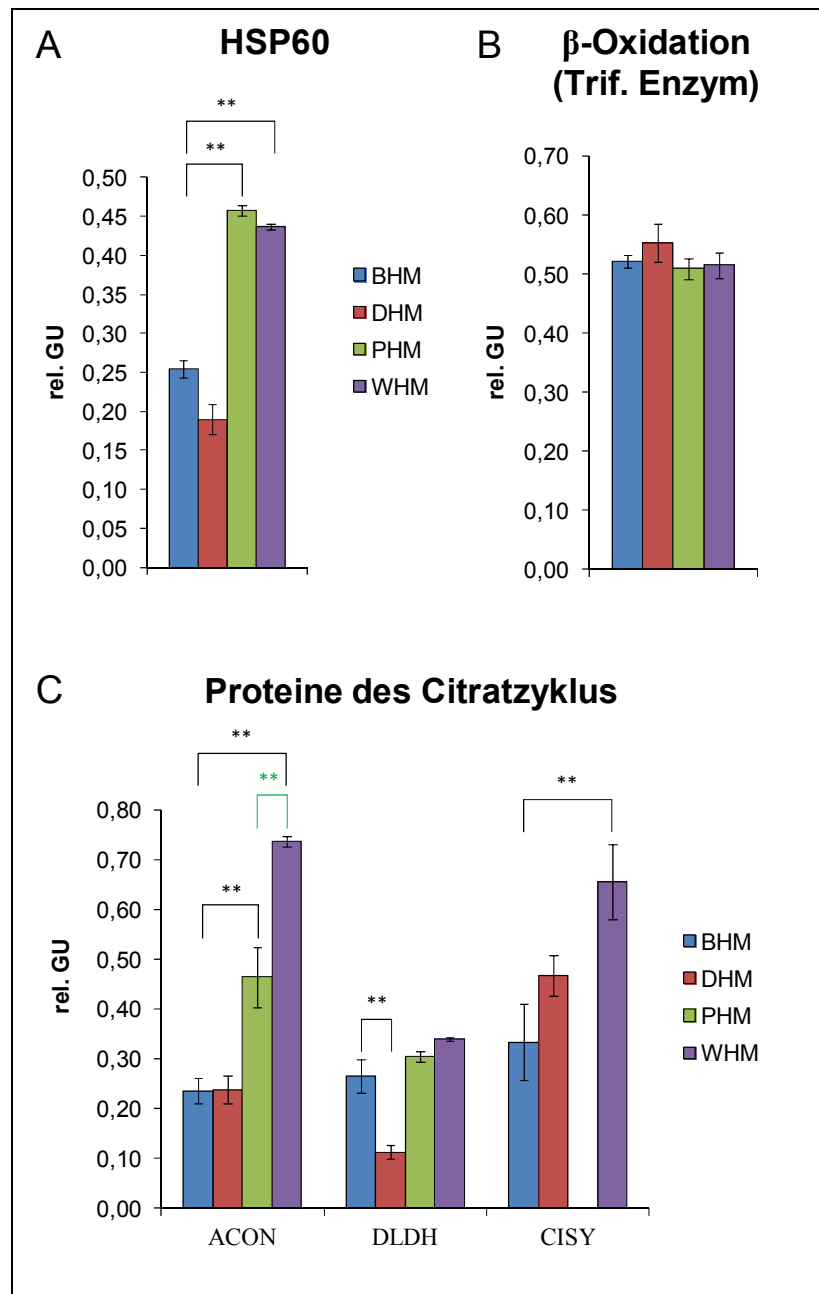


Abbildung 5.43: Proteinmengen der Untereinheiten für das Hitzeschockprotein HSP60 (A), das Trifunktionelle Enzym der β -Oxidation von Fettsäuren (B) und die Aconitase (ACON), Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLDH) und der Citrat-Synthase (CISO) (alle in C) von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.10) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate ($n = 3$) in relativen Graustufenwerten % [rel. GU] dargestellt. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM), grüne Sterne zeigen den Vergleich zwischen PHM und WHM.

5.1.5.2.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die Proteine in 2-D BN/SDS-Gelen von Herzmitochondrien aus Rind, Reh, Schwein und Wildschwein quantitativ analysiert. Die untersuchten Proben zeigen für Komplex I, III und V ähnliche Proteinmengen und eine ähnliche Organisation zu übergeordneten Strukturen (Superkomplexe, Homooligomere,...): Bei der ATP-Synthase (Komplex V) liegen 60 bis 74 %, abhängig vom Organismus, in monomerer Form V_1 vor. Bei Komplex I sind mehr als 55 % in Form von Superkomplex $I_1III_2IV_1$ (b), 25 % in Superkomplex I_1III_2 (a) und 10 % in Superkomplex $I_1III_2IV_2$ (c) gebunden. Ebenso zeigt sich bei Komplex III, dass der Anteil an Superkomplex b etwas höher ist im Vergleich zu Superkomplex a und der individuellen Form III_2 .

Die größten Unterschiede treten bei der Proteinmenge für den Komplex IV auf. Dort besitzt PHM den mit Abstand größten Wert und BHM weist im Vergleich dazu eine um 40 % niedrigere Proteinmenge auf. Wiederum zeigen alle Proben bei der Organisation von Komplex IV eine ähnliche Verteilung. Dementsprechend liegt dieser Enzymkomplex zum Großteil in individueller Form IV_1 vor, auf das Dimer IV_2 und den Superkomplex III_2IV_1 entfallen jeweils nur zwischen 10 und 15 %. Diese Resultate deuten darauf hin, dass bei den Superkomplexen $I_1III_2IV_1$ (b) die bevorzugte Assemblierung bei diesen unterschiedlichen Organismen darstellt. Da es sich bei den Gewebeproben jeweils nur um ein biologisches Replikat ($n = 1$) müsste daher weitere Experimente mit einer größeren Anzahl an Replikaten durchgeführt, um diese Theorie zu bestätigen.

5.1.5.3 Herzmitochondrien aus Rind, Maus und Ratte (Fischer)

Bei den untersuchten Herzproben aus Maus und Ratte handelt es sich um männliche Labormäuse C57BC/6J der Spezies *Mus musculus* (MHM) und männliche Fischer-Ratten F344/DuCrIj der Spezies *Rattus norvegicus* (R_FHM). Hier wurde für die Isolierung der Mitochondrien aus dem Gewebe jeweils mehrere Herzen (Maus: 7; Ratte: 3) verwendet. Für BHM wurden die Daten aus dem Abschnitt 5.1.5.2 benutzt.

Für die in den Abschnitten 5.1.2.2 und 5.1.3.3 diskutierten In-Gel Aktivitätstests für Komplex I und IV wurden Proben von Fischer- und Wistar-Ratten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die beiden Rattenproben ein sehr ähnliches elektrophoretisches Laufverhalten in BN-Gelen besitzen und ähnliche Aktivitäten bei den Komplexen und Superkomplexen aufweisen. Daher wird für die quantitative Auswertung des mitochondrialen Proteoms nur die Probe R_FHM verwendet. Es wurden jeweils 3 technische Replikate von den Proben hergestellt. Für die Zuordnung und Identifizierung der Proteinspots in 2-D Gelen von Ratte wird auf die Arbeit von Reifschneider^[5, 94] und Thilmany^[95] verwiesen.

Da sich für die Untereinheiten der OxPhos-Komplexe ein ähnliches Verteilungsmuster wie in den Kapiteln von Abschnitt 5.1.5.2 ergibt, werden im Folgenden nur die summierten Proteinmengen der Komplexe und Superkomplexe dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu BHM werden mit schwarzen Sternen (* bzw. **) gekennzeichnet, Unterschiede zwischen MHM und R_FHM mit roten Sternen (* bzw. **). Die für diese Auswertungen verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.11) gezeigt.

5.1.5.3.1 Komplex V

Die ATP-Synthase kann in den Sypro[®] Ruby gefärbten Gelen als Monomer (V₁) sowie in den oligomeren Formen Dimer (V₂), Trimer (V₃) und Tetramer (V₄) nachgewiesen werden. Für die Quantifizierung der Proteinmenge des Monomers und des Dimers werden die Untereinheiten α , β , γ , b1 und OSCP, für das Trimer und das Tetramer werden die Untereinheiten α , β und γ und OSCP verwendet.

In Abbildung 5.44 ist zu erkennen, dass die Proteinmenge für das Monomer der ATP-Synthase bei BHM, MHM und R_FHM ähnliche Werte im Bereich 9,00 relative Graustufen-einheiten aufweist. Bei der dimeren Form zeigen die Proben aus Rattenherz einen deutlich höheren Wert (Vgl zu BHM: 104 % ; Vgl zu MHM: 263 %; beide stat. sig.). MHM zeigt im Vergleich zu BHM eine um 44 % niedrigere Proteinmenge (stat. sig.). Einen ähnlichen Trend bei der Verteilung ist auch bei dem Trimer von Komplex V zu sehen. Bedingt durch die großen Fehlerbalken ergibt sich nur zwischen den Proben aus Maus und Ratte ein statistisch signifikanter Unterschied (119 %). In Abbildung 5.44 D sind die summierten Intensitäten der Graustufenwerte für das Tetramer dargestellt. BHM besitzt mit Abstand die größte Proteinmenge (stat. sig.). Im Vergleich zu den anderen oligomeren Formen der ATP-Synthase besitzt auch hier MHM die niedrigste Proteinmenge.

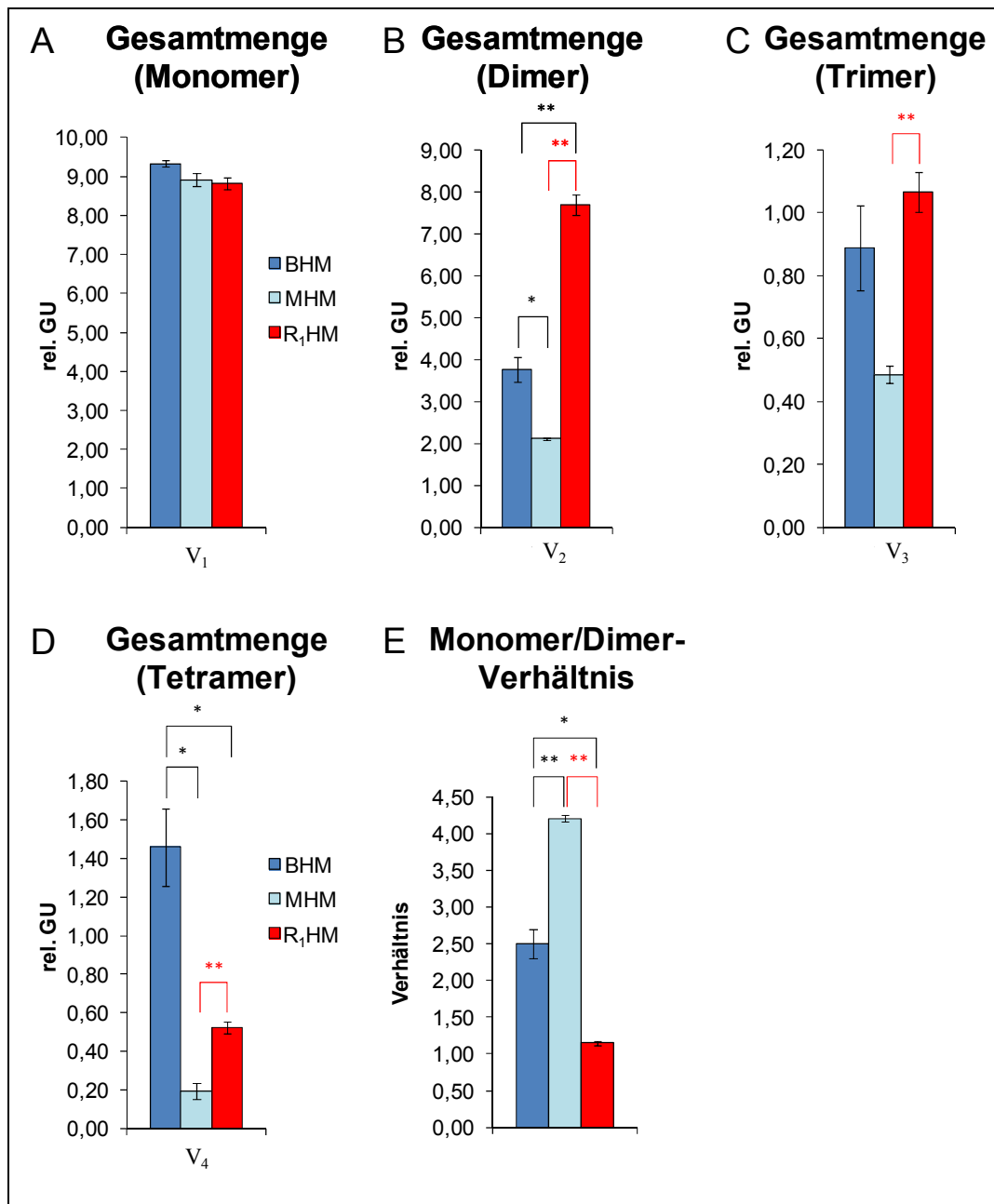


Abbildung 5.44: Proteinmengen der Untereinheiten für das Monomer und die oligomeren Formen der ATP-Synthase in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, MHM und R_FHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.11) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. Die summierten Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten von α , β , γ , b1 und OSCP für das Monomer (A) bzw. Dimer (B) bzw. die summierten Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten von α , β , γ und OSCP für das Trimer (C) bzw. Tetramer (D). Monomer/Dimer-Verhältnis (E). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs MHM, BHM vs R_FHM), rote Sterne zeigen den Vergleich zwischen MHM und R_FHM.

Die deutlichen Unterschiede zwischen Monomer und Dimer für die verschiedenen Proben sind noch einmal im Diagramm für das Monomer/Dimer-Verhältnis (Abbildung 5.44 E) gezeigt. Für die Proben aus Rattenherz ergibt sich ein sehr niedriges Verhältnis von 1,15 (stat. sig). Das bedeutet, dass V_1 und V_2 näherungsweise im gleichen Verhältnis (1:1) vorliegen.

Dies zeigt sich auch in den Werten, die den Diagrammen zugrunde liegen: Monomer 8,83 bzw. Dimer 7,70 rel. GU. Auch im Vergleich zu den Verhältnissen von DHM, PHM und WHM (Abbildung 5.36 C) ist dies mit Abstand der niedrigste Wert. Garcia *et al.* ^[74] haben bei Untersuchungen der ATP-Synthase aus isolierten Rattenlebermitochondrien ein ähnliches Monomer/Dimer-Verhältnis von 1,2 gefunden. Die Proteine wurden mit einem Detergens/Protein-Verhältnis von 1,5 g/g solubilisiert^[74]. Mittels BN-PAGE wurden die Solubilisate elektrophoretisch aufgetrennt und nach anschließender Coomassie-Färbung wurden die Banden von V_1 und V_2 densitometrisch ausgewertet. Thilamny^[95] hat bei Herzmitochondrien aus Fischerratten ein etwas höheres Monomer/Dimer-Verhältnis von 1,5 gefunden. Bei der Auswertung wurde ähnlich vorgegangen, nach einer Sypro Ruby-Färbung von 2-D BN/SDS-Gelen wurden die Untereinheiten mit Delta2D quantifiziert.

Für MHM ist in Abbildung 5.44 E ein deutlich anderes Monomer/Dimer-Verhältnis von 4,2 zu sehen, der Hauptteil an ATP-Synthase liegt in monomerer Form vor. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Nakamura *et al.* ^[212] erhalten. Sie konnten zeigen, dass Komplex V aus Mausherzmitochondrien zu 84 % als Monomer vorliegt. Dies entspricht umgerechnet einem Verhältnis von 5,2. Für BHM zeigt sich, wie bereits in Abbildung 5.36 C dargestellt, ein Monomer/Dimer-Verhältnis von 2,5. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen von Tomasetig *et al.* ^[213] überein.

In Abbildung 5.45 B ist die Gesamtproteinmenge an ATP-Synthase dargestellt. Es ist zu sehen, dass R_FHM den höchsten Wert im Vergleich zu BHM (um 24 %) und MHM (um 55 %) zeigt (in beiden Fällen stat. sig). Ebenso ist zu erkennen, dass MHM die geringste Proteinmenge an Komplex V besitzt.

Die prozentuale Verteilung der ATP-Synthase auf das Monomer und die oligomeren Formen Dimer, Trimer und Tetramer ist in Abbildung 5.45 A gezeigt. Da für das Trimer und Tetramer die Untereinheit b1 nicht für die Auswertung verwendet worden ist, bezieht sich diese Darstellung auf die Untereinheiten α , β , γ und OSCP. Wie erwartet ist bei R_FHM der Anteil an Monomer kleiner und an Dimer größer ist als bei BHM bzw. MHM. Bei den Proben aus Maus ist wiederum eine deutlich andere Verteilung von Komplex V zu beobachten, das Monomer besitzt einen Anteil von 76 % und das Dimer einen Anteil von 18 %. Interessanterweise zeigen alle Proben für das Trimer ähnliche Werte im Bereich zwischen 5 und 6 %. Für das Tetramer besitzt BHM einen deutlich größeren Anteil von 10 % im Vergleich zu MHM (2 %) und R_FHM (3 %).

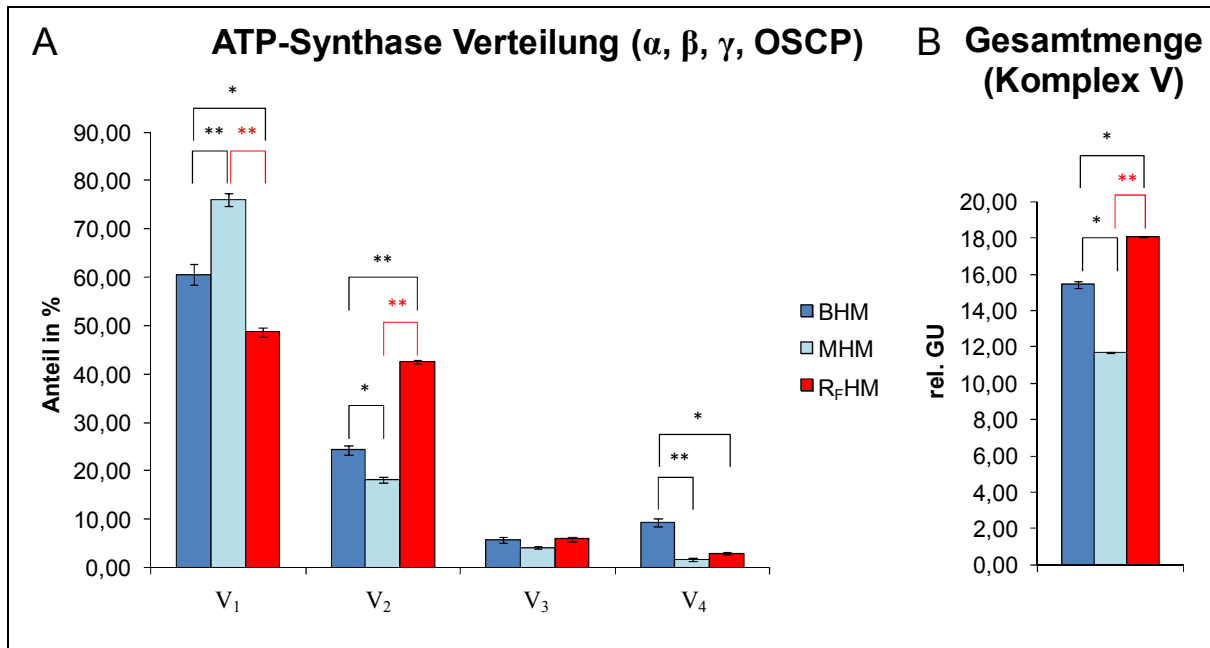


Abbildung 5.45: prozentuale Verteilung der ATP-Synthase (α , β , γ , OSCP) als Monomer V₁, Dimer V₂, Trimer V₃ und Tetramer V₄ (A) und Gesamtproteinmenge von Komplex V (B) in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, MHM und R_FHM. Die für die Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.11) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. Die Signifikanzniveaus sind identisch mit **Abbildung 5.44**. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs MHM, BHM vs R_FHM), rote Sterne zeigen den Vergleich zwischen MHM und R_FHM.

5.1.5.3.2 Komplex I

Für die Quantifizierung der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) von BHM, MHM und R_FHM in den Superkomplexen I₁III₂ (a) und I₁III₂IV₁ (b) werden die Untereinheiten NDUS1, NDUS2 und NDUA9 verwendet. Hier sei auf die Arbeit von Gomez *et al.* [177] verwiesen, die für die Superkomplexe a bis d aus Rattenherzmitochondrien NDUS1 und NDUA9 mittels LC-MALDI-MS/MS identifiziert haben. Ebenso haben Reifschneider *et al.* [5] die Untereinheit NDUS1 für Superkomplex a und b in 2-D BN/SDS-Gelen von Rattenherzmitochondrien nachgewiesen. Für Superkomplex I₁III₂IV₂ (c) wird nur die Proteinmenge für die Untereinheit NDUS1 ausgewertet. Für den individuellen Komplex I konnte zwar bei allen Proben diese 75 kDa Untereinheit nachgewiesen werden, allerdings war bei einigen Sypro[®] Ruby gefärbten Gelen von MHM keine eindeutige Zuordnung mit der Software Delta2D möglich. Daher wird ähnlich wie in Abschnitt 5.1.5.2.2 auf eine Auswertung dieses Proteinspots verzichtet.

Für den Superkomplex a (Abbildung 5.46 A) ist zu erkennen, dass MHM mit Abstand den höchsten Wert besitzt. Im Vergleich zu den anderen Proben ist der Wert um 126 % größer (beide stat. sig.). BHM und R_FHM zeigen relative ähnliche Proteinmengen. Bereits in Abschnitt 5.1.2.2, bei der Zuordnung der Proteinbanden in BN-Gelen, war zu erkennen, dass bei MHM Superkomplex a einen deutlich höheren Anteil an den Superkomplexen besitzt als bei den Proben von Rattenherzmitochondrien. Dies zeigte sich sowohl bei der Intensität der Coomassie gefärbten Banden als auch bei der Bildung des farbigen Präzipitats bei den In-Gel

Aktivitätstests. Die hier gefundenen Ergebnisse für die Proteinmenge von Superkomplex a bestätigen diese Beobachtungen.

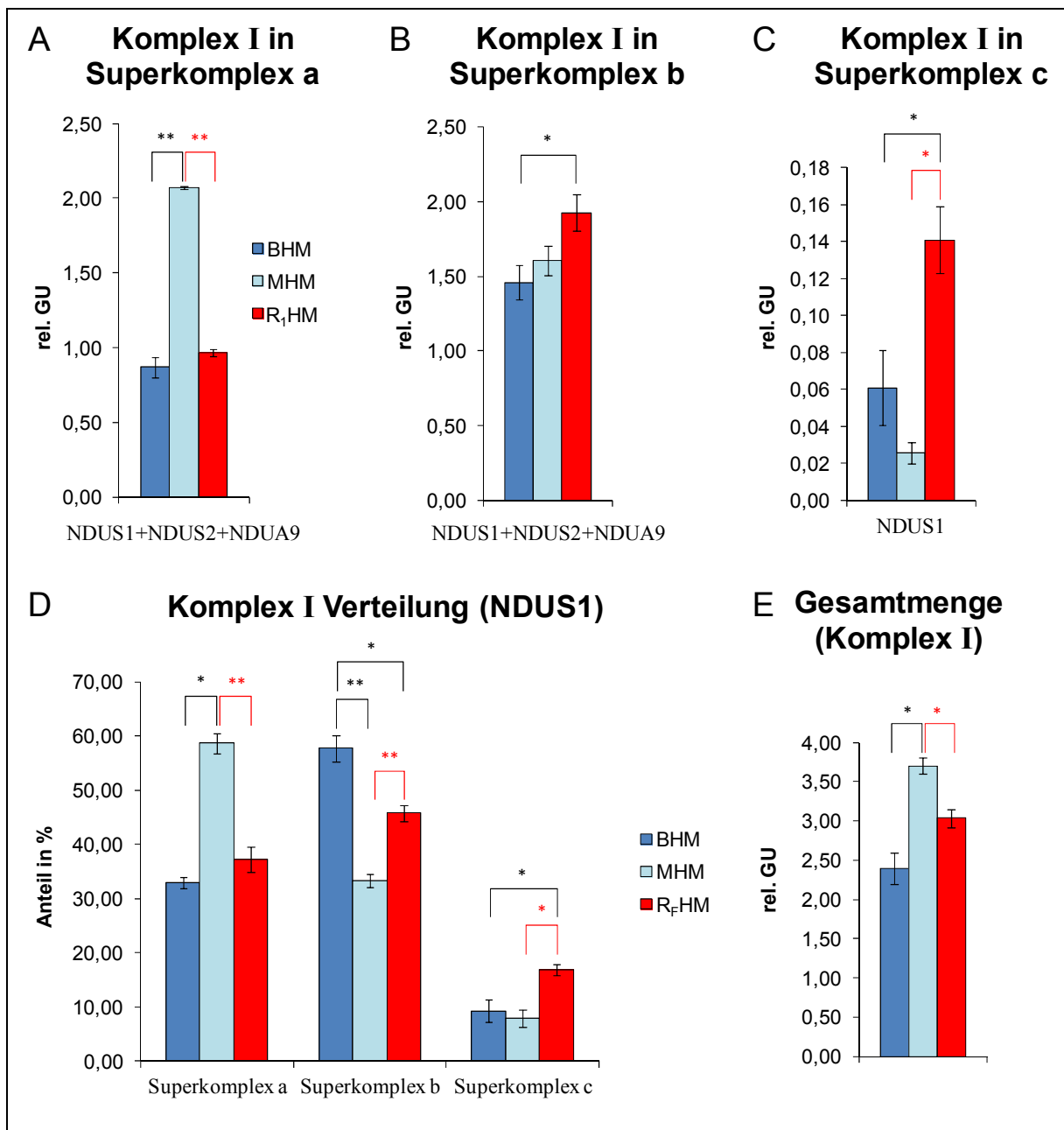


Abbildung 5.46: Proteinmengen der Untereinheiten für Komplex I in den Superkomplexen a, b und c (A-C, D), die prozentuale Verteilung der Untereinheit NDUS1 auf die Superkomplexe a, b und c (D) und die Gesamtproteinmenge von Komplex I (E) in den 2-D BN/ SDS-Gelen von BHM, MHM und R_FHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.11) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A:** bzw. **B:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten NDUS1, NDUS2 und NDUA9 in den Superkomplexen a und b. **C:** die Intensitäten der Graustufenwerte von NDUS1 für Komplex I in Superkomplex c. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs MHM, BHM vs R_FHM), rote Sterne zeigen den Vergleich zwischen MHM und R_FHM.

Bei Superkomplex b (Abbildung 5.46 B) besitzen BHM und MHM eine ähnliche Proteinmenge. Nur die Proben von Ratte zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied (um 15%). Für die Untereinheit NDUS1 von Superkomplex c besitzt R_FHM mit 0,14 relativen Graustufeneinheiten eine deutlich höhere Proteinmenge, dies bedeutet im Vergleich zu BHM bzw. MHM einen um 131 bzw. 448 % höheren Wert (beide stat. sig.). Aufgrund der großen Fehlertoleranzen ist der Unterschied zwischen Rind und Maus (58 %) statistisch nicht signifikant.

In Abbildung 5.46 E ist die Gesamtproteinmenge für Komplex in den Superkomplexen a, b und c dargestellt. Hierbei handelt es sich um die summierten Werte aus den Abbildung A, B und C. Es ist zu erkennen, dass MHM im Vergleich zu den anderen Proben eine größere Proteinmenge besitzt (stat. sig.).

Da für die Quantifizierung von Komplex I in Superkomplex c nur NDUS1 verwendet worden ist, wird für die prozentuale Verteilung (Abbildung 5.46 D) auf die Superkomplexe auch nur diese Untereinheit berücksichtigt. Hier zeigt sich wie bereits in den vorherigen Abschnitten ein deutlicher Unterschied zwischen MHM und BHM. Während bei MHM Superkomplex a den größten Anteil (56 %) an den Superkomplexen besitzt, ist dies bei BHM der Superkomplex b (61 %). Im Gegensatz dazu zeigen die Proben von Rattenherz für beide Superkomplexe einen ähnlichen Wert (39 bzw. 45 %). Bei allen Proben ist der Anteil für den Superkomplex c am kleinsten.

5.1.5.3.3 Komplex III

Für die Analyse der Proteinmenge der Cytochrome-*c*-Oxidoreduktase (Komplex III) in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, MHM und R_FHM werden die Proteinspots der Untereinheiten QCR2, QCR7 und UCRI verwendet. Es wird die Proteinmenge für den individuellen Komplex, der nur als Dimer vorliegt, und die Superkomplexe a und b ermittelt. In den Arbeiten von Gomez *et al.* ^[177] konnten für die Atmungskettenproteine aus Rattenherz nur die Untereinheiten QCR1 (Dimer, Superkomplexe a bis d) und QCR7, UCRI (Dimer) identifiziert werden. Reifschneider *et al.* ^[5] haben in 2-D BN/SDS-Gelen von Rattenherzmitochondrien die Untereinheiten UCRI in dem individuellen Komplex und dem Superkomplex III₂IV₁ nachgewiesen. Für Superkomplex c konnten mittels PMF keine Untereinheiten identifiziert werden. Ebenso war keine eindeutige Zuordnung der Untereinheit QCR2 mittels 2-D Western Blot möglich, da die Spots im Bereich der Superkomplexe zu diffus waren.

Anhand von Abbildung 5.47 ist zu erkennen, dass für den individuellen Komplex III₂ BHM eine deutlich größere Proteinmenge besitzt, im Vergleich zu MHM und R_FHM ein Unterschied um 45 % (beide stat. sig.). Die Proben von Maus- und Rattenherz zeigen nahezu identische Werte für die Proteinmenge. Für Superkomplex a ist ein ähnlicher Trend wie im vorherigen Abschnitt zu sehen, jedoch nicht so stark ausgeprägt. MHM besitzt den höchsten Wert, allerdings sind die Unterschiede zu BHM und R_FHM deutlich kleiner (22 bzw. 34 %). Im Fall von R_FHM handelt es sich um einen statistisch signifikanten Unterschied. Für den

individuellen Komplex III₂ in Rind und Ratte liegen die Werte wiederum in einem ähnlichen Bereich.

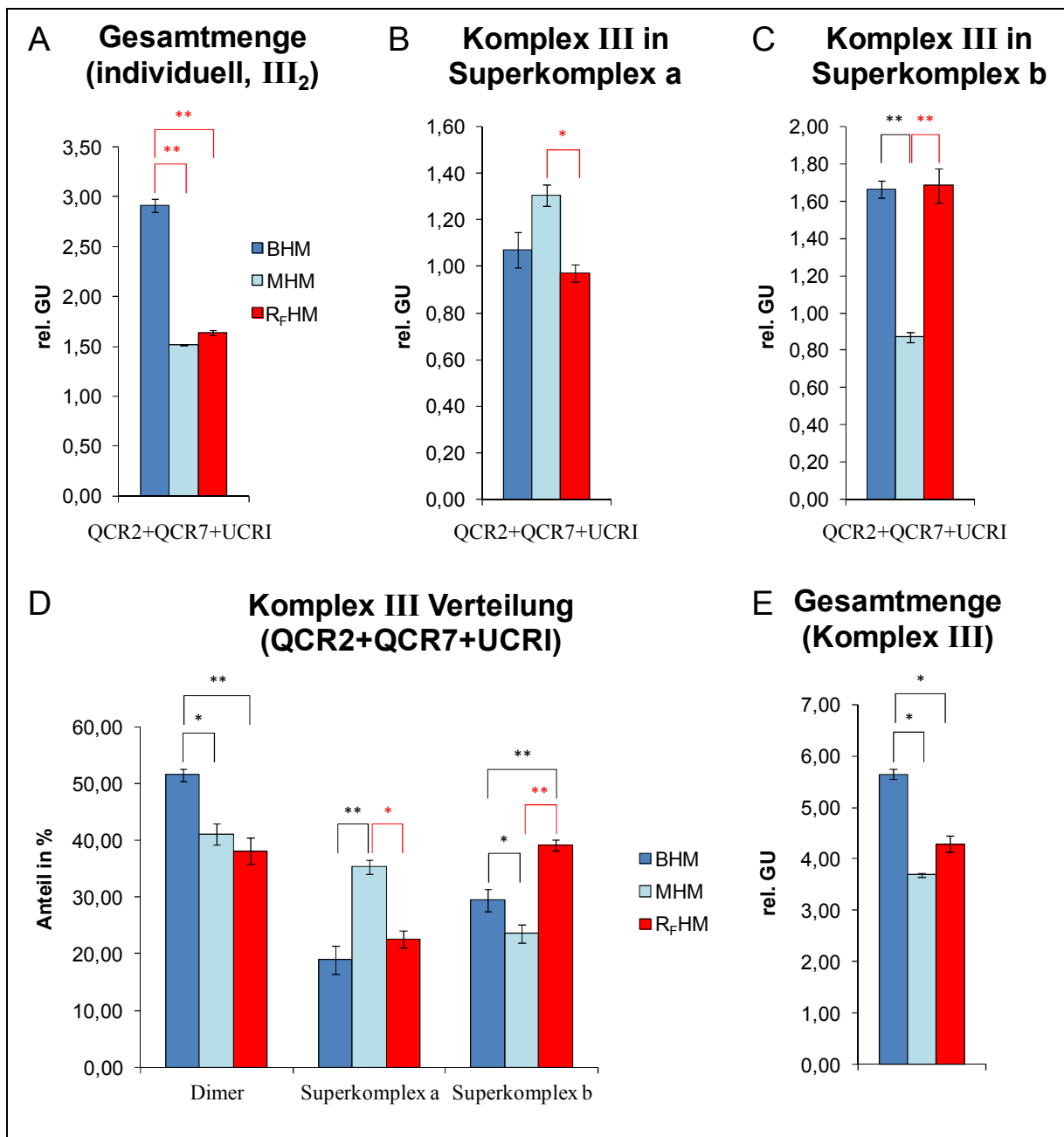


Abbildung 5.47: Proteinmengen der Untereinheiten für Komplex III in der individuellen Form (Dimer) und in den Superkomplexen a und b (A-C), die prozentuale Verteilung der Untereinheiten QCR2, QCR7, UCRI auf das Dimer und die Superkomplexe a und b (D) und die Gesamtproteinmenge von Komplex III (E) in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, MHM und RfHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.11) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A-C:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten QCR2, QCR7 und UCRI in der individuellen Form (Dimer, III₂) und den Superkomplexen a und b. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs MHM, BHM vs RfHM), rote Sterne zeigen den Vergleich zwischen MHM und RfHM.

Bei Superkomplex b (Abbildung 5.47 C) zeigt MHM eine signifikant kleinere Proteinmenge, im Vergleich zu BHM bzw. R_FHM um 48 %. Die Proben aus Ratten- bzw. Rinderherz zeigen erneut nahezu identische Werte.

Bei einem Vergleich der Gesamtproteinmenge (Abbildung 5.47 E) für Komplex III ist zu erkennen, dass BHM eine signifikant größere Proteinmenge als MHM und R_FHM besitzt. Die Unterschiede liegen im Bereich 24 bzw. 35 %. Zwischen MHM und R_FHM, zeigt sich für R_FHM eine größere Proteinmenge (16 %, stat. n. sig.).

Die prozentuale Verteilung von Komplex III auf den individuellen Komplex III₂ und die Superkomplexe a und b ist in Abbildung 5.47 D dargestellt. Für BHM entfällt der größte Anteil 52 % auf den individuellen Komplex, der Superkomplex a 19 % und der Superkomplex b 30 %. Bei MHM und R_FHM sind die Werte für III₂ nahezu identisch (38 bzw. 39 %). Jedoch ist die Verteilung bei den Superkomplexen sehr unterschiedlich und es ist ein ähnlicher Trend wie bereits bei Komplex I zu beobachten (Abbildung 5.46 D). Während MHM einen höheren Anteil für Superkomplex a (36 %) als für b (21 %) besitzt, ist bei R_FHM dieses Verhältnis genau umgekehrt (a 38 % bzw. b 22 %).

Untersuchungen von Moreno-Lastres *et al.* ^[214] an humanen Fibroblastenzelllinien haben gezeigt, dass 50 % von Komplex III in Form von Superkomplexen a bis d, 40 % in Form des individuellen Komplexes III₂ und 10 % in Form des Superkomplexes III₂IV₁ vorliegen. Für diese Ergebnisse wurden die Proteinspots QCR2 und UCRI in 2-D BN/SDS-Gelen quantifiziert. Frenzel *et al.* ^[149] untersuchten Komplex III in Rattenhirnmitochondrien. Sie fanden heraus, dass nur 13 % des Komplexes in individueller Form vorliegt.

5.1.5.3.4 Komplex IV

Für die Quantifizierung der Cytochrom-*c*-Reduktase (Komplex IV) von BHM, MHM und R_FHM werden die Proteinspots des individuellen Komplexes IV₁, des Dimers IV₂ und des Superkomplexes III₂IV₁ berücksichtigt. Im Bereich der Superkomplexe konnten mittels PMF keine Untereinheiten von Komplex IV nachgewiesen werden. Die 2-D Western Blots von MHM (Abschnitt 5.1.4.1) und BHM (Dissertation von Decker^[139]) zeigen zwar in diesem Bereich für die Untereinheit COX1 ein positives Signal, allerdings ist dieses zu diffus um eine eindeutige Zuordnung zu einem der Superkomplexe vorzunehmen. Für die quantitative Analyse des individuellen Komplexes IV₁ werden die Untereinheiten COX1, COX2, COX41, COX5A und COX6B1, für die Analyse des Dimers IV₂ und des Komplexes III₂IV₁ wird nur die Untereinheit COX1 verwendet.

In Abbildung 5.48 ist zu erkennen, dass die Proteinmengen für den individuellen Komplex IV₁ bei MHM und R_FHM nahezu identisch sind. Bei BHM ist der Graustufenwert niedriger (um 30 %, Vgl. R_FHM stat. sig.). Bei der dimeren Form IV₂ zeigen die Proben aus Mäuseherzmitochondrien eine deutlich größere Proteinmenge, im Vergleich zu BHM ein Unterschied um 119 % und im Vergleich zu R_FHM um 105 % (beide stat. sig.). Des Weiteren

weisen die Proben aus Rattenherzmitochondrien eine signifikant größere Proteinmenge als die Proben aus Rinderherzmitochondrien auf (um 30 %).

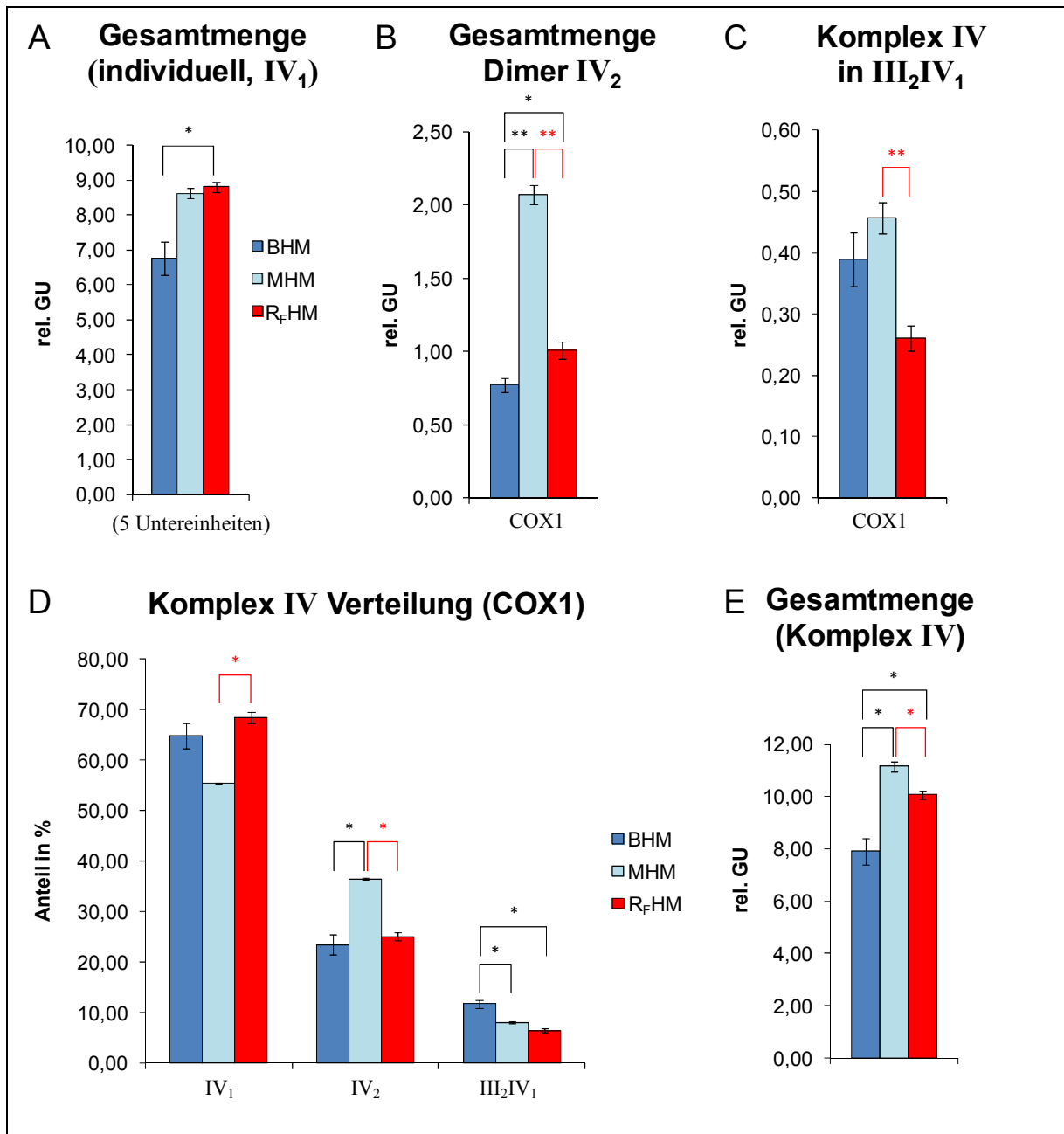


Abbildung 5.48: Proteinmengen der Untereinheiten für Komplex IV in der individuellen Form IV₁, in dimerer Form IV₂ und in dem Superkomplex III₂IV₁ (A-C), die prozentuale Verteilung der Untereinheit COX1 auf IV₁, IV₂ und III₂IV₁ (D) und die Gesamtproteinmenge von Komplex IV (E) in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, MHM und R_fHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.11) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten COX1, COX2, COX41, COX5A und COX6B1 für den individuellen Komplex. **B, C:** die Intensität des Graustufenwertes der Untereinheit COX1 für das Dimer IV₂ und den Superkomplex III₂IV₁. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs MHM, BHM vs R_fHM), rote Sterne zeigen den Vergleich zwischen MHM und R_fHM.

Für den Superkomplex III_2IV_1 (Abbildung 5.48 C) besitzt R_FHM im Vergleich zu MHM bzw. BHM einen um 38 % niedrigeren Graustufenwert (Mittelwert, stat. sig. für R_FHM). Bedingt durch die großen Fehlerbalken bei BHM sind die Unterschiede in der Proteinmenge statistisch nicht signifikant.

Bei der in Abbildung 5.48 E dargestellten Gesamtproteinmenge von Komplex IV handelt es sich um die summierten Werte der fünf Untereinheiten für IV_1 und der Untereinheit COX1 für IV_2 und III_2IV_1 . Es fällt auf, dass die Proteinmenge von Komplex IV aus Mäuseherzmitochondrien am größten ist (stat. sig. zu R_FHM und BHM). BHM besitzt den niedrigsten Graustufenwert für Komplex IV. Im Vergleich zu MHM entspricht dies einem Unterschied von 41 % und im Vergleich zu R_FHM von 27 % (beide stat. sig.).

Die prozentuale Verteilung von Komplex IV auf den individuellen Komplex, das Dimer und den Superkomplex III_2IV_1 (Abbildung 5.48 D) zeigt, dass bei allen Proben der Hauptanteil in Form von IV_1 vorliegt. Dies stellt sich wie folgt dar: für BHM 65 %, für MHM 55 % und für R_FHM 68 %. Dies deckt sich auch mit den in Abschnitt 5.1.5.2.4 gefundenen Ergebnissen für die Verteilung von Komplex IV in den solubilisierten mitochondrialen Proteinen aus Reh-, Schwein- und Wildschweinherz. Dort betrug der Anteil für den individuellen Komplex IV_1 zwischen 75 und 80 %.

Hier sei auch auf die Ergebnisse von Moreno-Lastres *et al.* ^[214] an humanen Fibroblastenzelllinien verwiesen. Die Proteinspots der Untereinheiten COX1 und COX5A wurden bei den Superkomplexen und dem individuellen Komplex in 2-D BN/SDS-Gelen quantifiziert wurden. Es zeigte sich ebenfalls, dass 65 bis 70 % in Form von IV_1 vorliegen, in den Superkomplexen a bis d sind 30 % gebunden und in dem Superkomplex III_2IV_1 zwischen 1 und 3 %.

Die Ergebnisse von Thilmany ^[95] zeigen einen ähnlichen Trend. Eine quantitative Analyse des Komplexes IV von Rattenherzmitochondrien (Fischer) zeigte, dass der Hauptteil (45 bis 55 %) als individueller Komplex IV_1 vorliegt. Hierbei wurden allerdings nur die Proteinmengen des Monomers mit der des Dimers und Trimers verglichen.

Ebenso bestätigen die Daten von Kratochwil ^[3], dass bei Komplex IV mehr als 50 % in Form von IV_1 vorliegen. Untersucht wurden die Mitochondrien der Gehirnnareale Cerebellum, Hippocampus und Cerebrum von Fischerratten. Für Komplex IV wurde die Proteinmenge der Untereinheit COX1 in dem individuellem Komplex, dem Dimer und dem Superkomplex III_2IV_1 in 2-D BN/SDS-Gelen quantifiziert.

5.1.5.3.5 Nicht-OxPhos-Proteine

Für die quantitative Analyse von Proteinen, die an anderen Stoffwechselvorgängen des Mitochondriums beteiligt sind, werden die Proteinmengen des Hitzeschockproteins HSP60, des Trifunktionellen Enzyms der β -Oxidation und von 3 Proteinen des Citratzyklus, die Aconitase (ACON), die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLDH) und die Citrat-Synthase (CISY), untersucht (siehe auch Abschnitt 5.1.4). Bei den Proteinen für den Citratzyklus kann

für die Proben aus Rattenherzmitochondrien der Proteinspot für die Citrat-Synthase auf den 2-D BN/SDS-Gelen nicht zugeordnet werden.

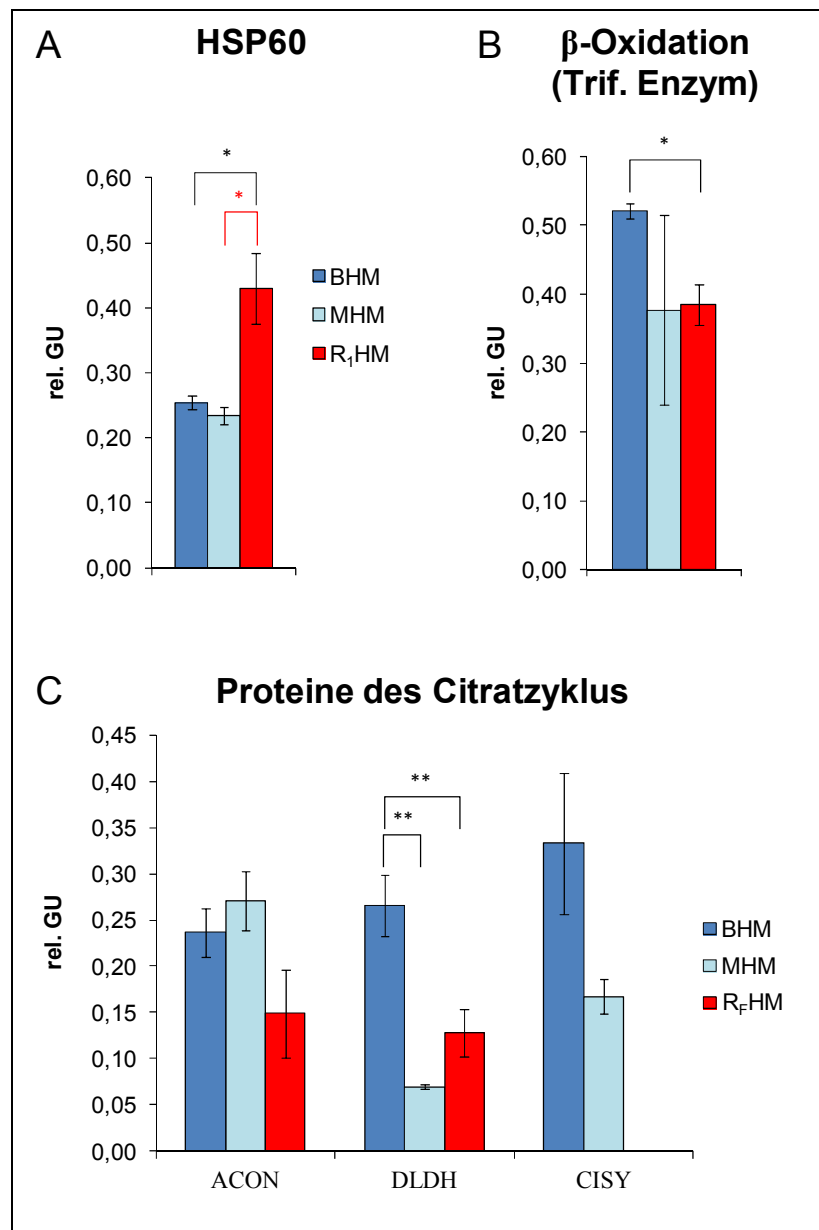


Abbildung 5.49: Proteinmengen der Untereinheiten für das Hitzeschockprotein HSP60 (A), das Trifunktionelle Enzym der β -Oxidation von Fettsäuren (B) und die Aconitase (ACON), Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLDH) und der Citrat-Synthase (CISO) (alle in C) in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, MHM und R_FHM. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.11) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate ($n = 3$) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs MHM, BHM vs R_FHM), der rote Stern zeigt den Vergleich zwischen MHM und R_FHM.

Bei R_FHM ist die größte Proteinmenge für das Hitzeschockprotein HSP60 zu finden (Abbildung 5.49 A). Für BHM und MHM ergeben sich um 69 % niedrigere Werte für die Proteinmenge (stat. sig.).

Während MHM und R_FHM nahezu identische Werte für das Trifunktionelle Enzym (Abbildung 5.49 B) besitzen, zeigt sich für BHM ein deutlich höher Wert (0,52 rel. GU). Aufgrund der sehr großen Fehlerbalken bei MHM ist dieser Unterschied nur im Vergleich zu R_FHM statistisch signifikant.

Für die Aconitase des Citratzyklus (Abbildung 5.49 C) ist zu erkennen, dass BHM und MHM die größte Proteinmenge aufweisen, R_FHM zeigt einen um 41 % niedrigeren Wert (im Mittel, stat. n. sig.). Bei der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase zeigt BHM den mit Abstand größten Wert (stat. sig.). Ebenso ist auch für die Citrat-Synthase bei BHM die größte Proteinmenge zu finden (stat. n. sig.).

5.1.5.3.6 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurden die Untereinheiten der OxPhos-Komplexe I, III, IV und V in 2-D BN/SDS-Gelen von Rinder-, Mäuse- und Rattenherzmitochondrien quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der strukturellen Organisation (Monomer/Oligomere) von Komplex V auftreten: Bei BHM liegen 60 % in monomerer Form vorliegen, bei MHM sind es 78 %. Im Gegensatz dazu sind bei R_FHM der Anteil von Monomer und Dimer nahezu gleich (ca. 45 %).

Für Komplex I besitzt MHM eine etwas höhere Gesamtproteinmenge, bei BHM und MHM liegen die Werte in einem ähnlichen Bereich. Auch hier treten bei der Verteilung auf die Superkomplexe einige Unterschiede auf. Während bei BHM und R_FHM Komplex I zu einem größeren Anteil in Superkomplex b gebunden ist (45 - 60 % der Proteinmenge), ist dies bei MHM Superkomplex a. Dieser Trend ist auch in abgeschwächter Form bei Komplex III zu beobachten, bei MHM ist der Anteil von Komplex III in Superkomplex a etwas größer, bei BHM und R_FHM trifft dies auf Superkomplex b zu. Wie in Abschnitt 5.1.5.2, liegt auch bei Maus und Ratte der größte Teil von Komplex IV in individueller Form vor.

Besonders bei den OxPhos-Komplexen aus Mäuseherzmitochondrien treten die größten Unterschiede, auch im Vergleich zu den in Abschnitt 5.1.5.2 untersuchten Proben auf. Daher stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse auf eine Detergensempfindlichkeit zurückzuführen sind oder bei Maus generell eine andere Organisation der Komplexe vorliegt. Für die erste Theorie würde sprechen, dass der Anteil an Superkomplex I₁III₂ (a) größer, ebenso würde es für Komplex V erklären, warum der Anteil an Monomer so hoch ist. Daher müssten weitere Experimente mit einer größeren Anzahl an biologischen Replikaten durchgeführt werden.

5.1.5.4 Rind (verschiedene Bezugsquellen)

Bei den hier untersuchten Proben handelt es sich um Isolierungen von Mitochondrien aus verschiedenen Rinderherzen. BHM_{alt} bezeichnet Herzgewebe, das seit November 2003 kontinuierlich bei -80 °C gelagert worden ist. Ich hatte zu Testzwecken bei einer ortsansässigen Metzgerei ein frisches Rinderherz bestellt. Nach der frischen Entnahme des Herzens wurde es über Nacht (beim Metzger) bei -20 °C gelagert und ich konnte es am folgenden Morgen holen. Dieses Gewebe wird als BHM_{FG} bezeichnet. Bereits während der Präparation war aufgefallen, dass das Gewebe an zahlreichen Stellen seltsame Verfärbungen aufwies.

Ähnlich wie in Abschnitt 5.1.5.2 werden im Folgenden nur die summierten Proteinmengen der Untereinheiten der Komplexe und Superkomplexe dargestellt. Die für diese Auswertungen verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.12) gezeigt. Die Normierung der relativen Graustufenwerte bzw. Proteinmengen erfolgte, wie bereits beschrieben, auf die Gesamtheit der im 2-BN/SDS-Gel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro[®] Ruby gefärbte Proteinspots. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu BHM werden mit schwarzen Sterne (* bzw. **) gekennzeichnet.

5.1.5.4.1 Komplex V

Im Abschnitt 5.1.2.4 wurden bereits In-Gel Aktivitätstests für den Komplex I und IV und eine Coomassie-Färbung des BN-Gels vorgestellt. Hierbei zeigte sich für BHM_{FG}, dass im Bereich des individuellen Komplexes V₁ und des Homodimers V₂ nur schwach gefärbte Banden auftreten. Dies deutet darauf hin, dass eine Degradation der ATP-Synthase stattgefunden hat. Ein präparativer Fehler bei der Probenvorbereitung kann ausgeschlossen werden, da Herstellung und Färbung der 2-D Gele zweimal wiederholt worden sind (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war bei BHM_{alt} ein identisches Bandenmuster (im Vergleich zu BHM) zu sehen.

In Abbildung 5.50 sind Ausschnitte von den Sypro[®] Ruby-gefärbten 2-D BN-SDS-Gelen von BHM (A) und BHM_{FG} (B) dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Untereinheiten α und β der individuellen Form der ATP-Synthase (V₁) und der Homooligomere (V₂, V₃ V₄) bei BHM blau markiert. Bei BHM_{FG} sind im Bereich des Monomers V₁ nebeneinander zwei Paare von Spots für die Untereinheiten α und β zu erkennen. Diese Proteinspots zeigen im Vergleich zu BHM eine deutlich niedrigere Intensität. Im Bereich des Dimers V₂ sind die Spots sehr verschmiert und daher nur sehr schlecht zu erkennen. Eine eindeutige Zuordnung der Untereinheiten α und β ist bei den höheren Oligomeren V₃ und V₄ überhaupt nicht mehr möglich.

Daher werden für die weitere Auswertung von Komplex V bei BHM_{FG} nur die Untereinheiten α und β im Bereich von V₁ (Spotpaare nebeneinander) berücksichtigt. Da bei den Spots für die anderen Atmungskettenkomplexe keine derartigen Unterschiede zu beobachten sind, wird bei der Auswertung ähnlich wie bei BHM und BHM_{alt} vorgegangen.

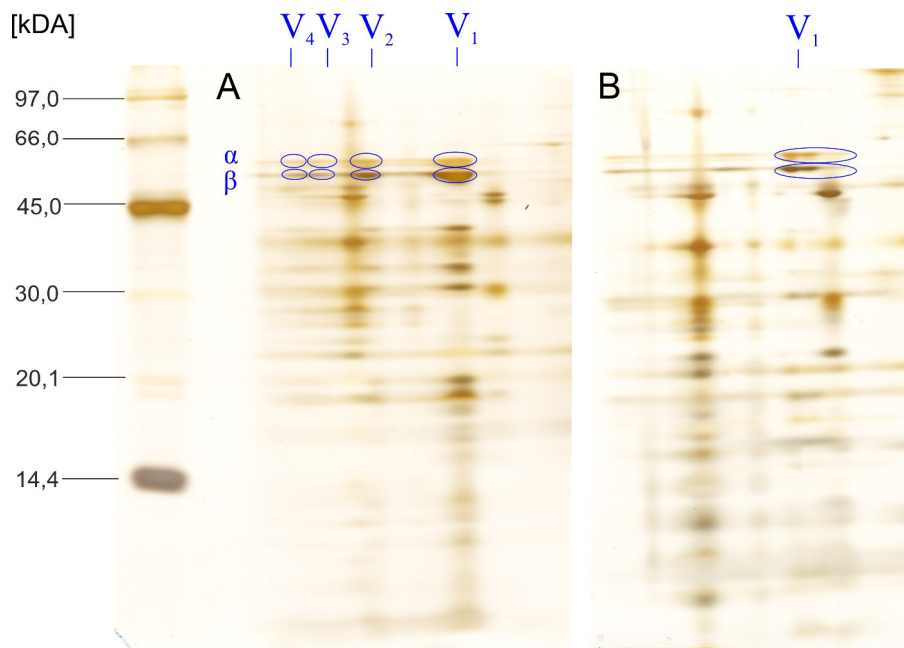


Abbildung 5.50: Ausschnitte von den Sypro® Ruby-gefärbten 2-D BN-SDS-Gelelektrophoresen BHM1 (A) und BHM_{FG} (B). Die vollständigen Gele sind im Anhang dargestellt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links). Bei BHM sind die Spots der Untereinheiten α und β für das Monomer V_1 , das Dimer V_2 , das Trimer V_3 und das Tetramer V_4 der ATP-Synthase blau markiert.

Bei BHM und BHM_{alt} werden für das Trimer und das Tetramer die Untereinheiten α , β , γ und b_1 und für das Monomer und das Dimer wird zusätzlich noch die Untereinheit OSCP quantifiziert. In Abbildung 5.51 A ist die Proteinmenge der Untereinheiten (in rel. GU) für V_1 noch einmal separat dargestellt. Hier ist für BHM_{FG} sehr gut zu sehen, dass die Spots im Bereich des Monomers eine sehr geringe Intensität besitzen.

In Abbildung 5.51 B sind die summierten Proteinmengen (nur für BHM und BHM_{alt}) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass für BHM_{alt} die Proteinmenge der ATP-Synthase signifikant höher ist (um 19 %, Vgl. BHM). Bei der dimeren Form sind die Werte für BHM und BHM_{alt} nahezu identisch. Bedingt durch die großen Fehlerbalken sind die Unterschiede bei Trimer und Tetramer statistisch nicht signifikant.

Anhand der Gesamtproteinmenge von Komplex V (Abbildung 5.51 F) ist zu sehen, dass BHM_{alt} im Vergleich zu BHM einen um 19 % (stat. sig.) höheren Proteinmenge besitzt.

Das Monomer/Dimer-Verhältnis ist in Abbildung 5.52 B dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei BHM_{alt} im Vergleich zu BHM ein statistisch signifikant höhere Verhältnis besitzt (um 31 %). Demzufolge ist bei BHM_{alt} der Anteil an ATP-Synthase in monomerer Form höher.

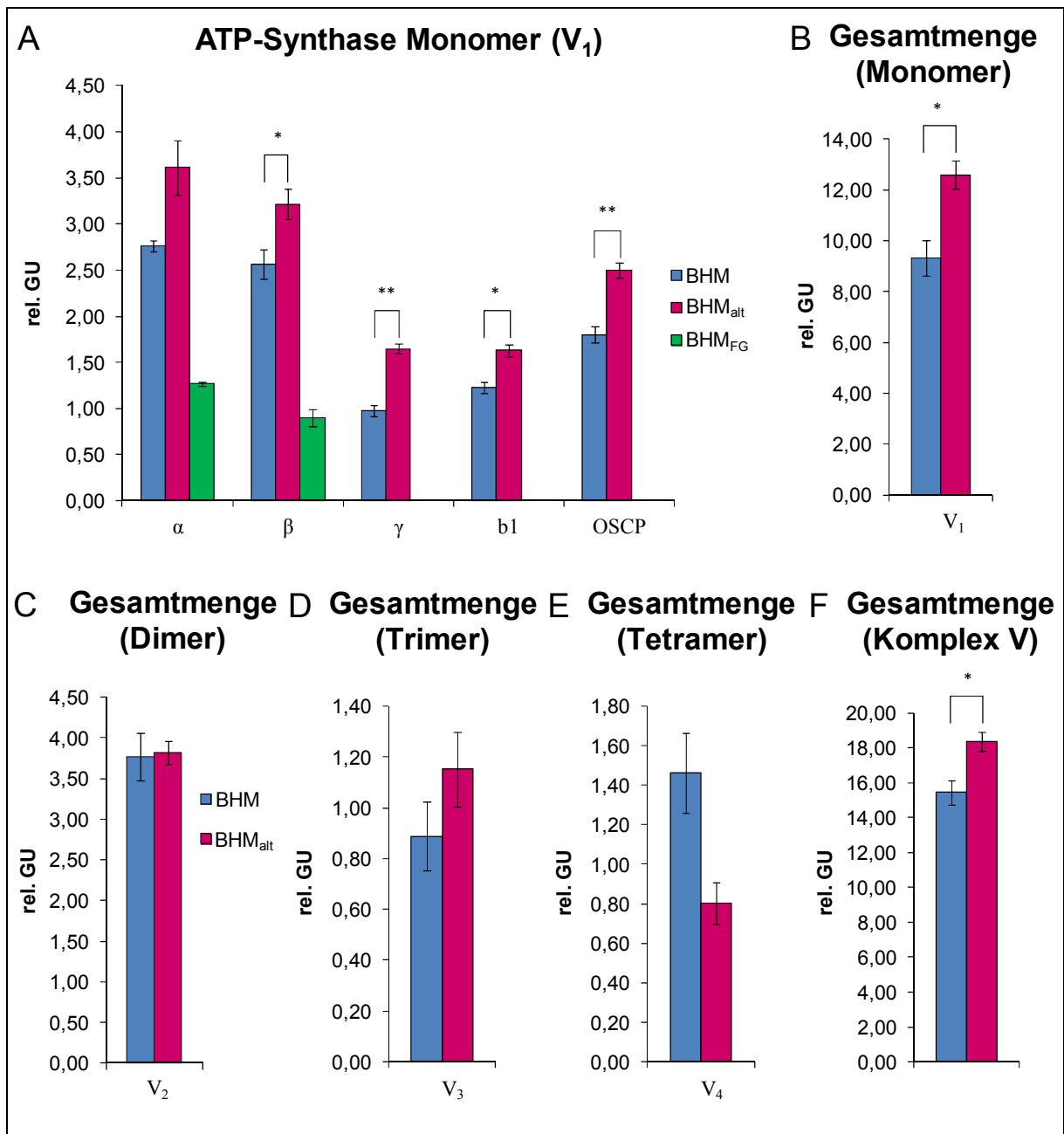


Abbildung 5.51: Proteinmengen der Untereinheiten für das Monomer, die oligomeren Formen der ATP-Synthase und die Gesamtproteinmenge der 2-D BN/SDS-Gele von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG}. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.12) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. Die summierten Intensitäten der Graustufenwerte dieser Untereinheiten für das Monomer (B) bzw. Dimer (C) bzw. die summierten Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten von α , β , γ und OSCP für das Trimer (D) bzw. Tetramer (E). Gesamtproteinmenge der ATP-Synthase (F). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs BHM_{alt}, BHM vs BHM_{FG}).

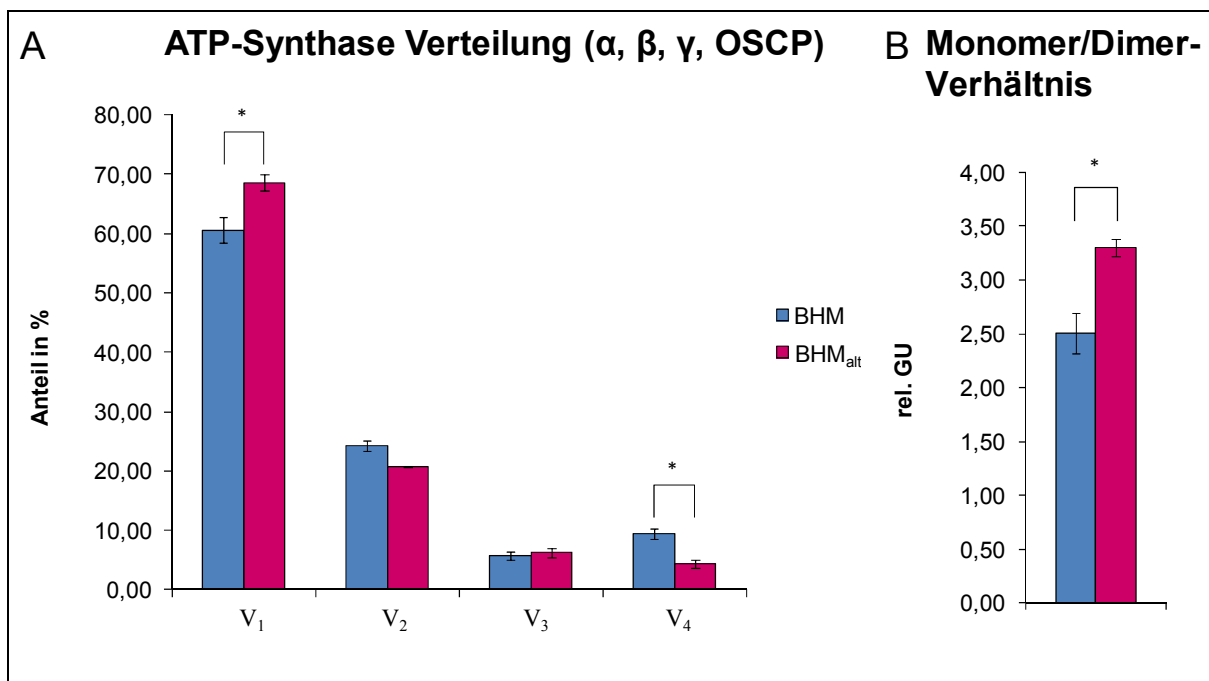


Abbildung 5.52: prozentuale Verteilung der ATP-Synthase (α , β , γ , OSCP) als Monomer V₁, Dimer V₂, Trimer V₃ und Tetramer V₄ (A) und Monomer/Dimer-Verhältnis (B) von BHM und BHM_{alt}. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.12) gezeigt. Da für BHM_{FG} nur einige Spots im Bereich des Monomers zu finden sind, werden diese Daten nicht gezeigt. Weitere Angaben sind identisch mit Abbildung 5.51.

In Abbildung 5.52 A ist eine Verteilung der ATP-Synthase als V₁, V₂, V₃ und V₄ gezeigt. Die hier dargestellten prozentualen Werte beziehen sich auf die Verhältnisse der Intensitäten der relativen Graustufenwerte aus den vorher gezeigten Daten. Da für das Trimer und Tetramer die Untereinheit b1 nicht in die Auswertung einbezogen werden konnte, werden für dieses Diagramm nur die Untereinheiten α , β , γ und OSCP verwendet. Wie bereits in Abschnitt 5.1.5.2.1 für BHM zu sehen war, liegt die ATP-Synthase unter diesen präparativen Bedingungen hauptsächlich in monomerer Form (61 %) vor. Bei BHM_{alt} ist der Anteil für das Monomer etwas höher (69 %, stat. sig.). Auf das Dimer entfallen 24 bzw. 21 %, auf das Trimer 6 % und auf das Tetramer 9 bzw. 4 %. Der Unterschiede zwischen den untersuchten Proben ist als sehr gering einzustufen. Bedenkt man, dass es sich bei BHM_{alt} um eine Gewebeprobe handelt, die schon älter als 10 Jahre ist, dann sind die hier gezeigten Ergebnisse sehr bemerkenswert.

5.1.5.4.2 Komplex I

Bei den quantitativen Aktivitätstests für Komplex I (Abschnitt 5.1.3.5) waren keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben zu erkennen. Sowohl bei den individuellen Komplexen als auch bei den Superkomplexen konnten farbige Präzipitate am Beispiel von BHM zugeordnet werden. Ebenso gab es nur kleine Unterschiede in Bezug auf die Intensität dieser Färbungen. Für die Quantifizierung der Proteinspots von Komplex I in den Superkomplexe a und b werden die Untereinheiten NDUS1, NDUS2 und NDUA9, bei Superkomplex c wird nur die Untereinheit NDUS1 verwendet.

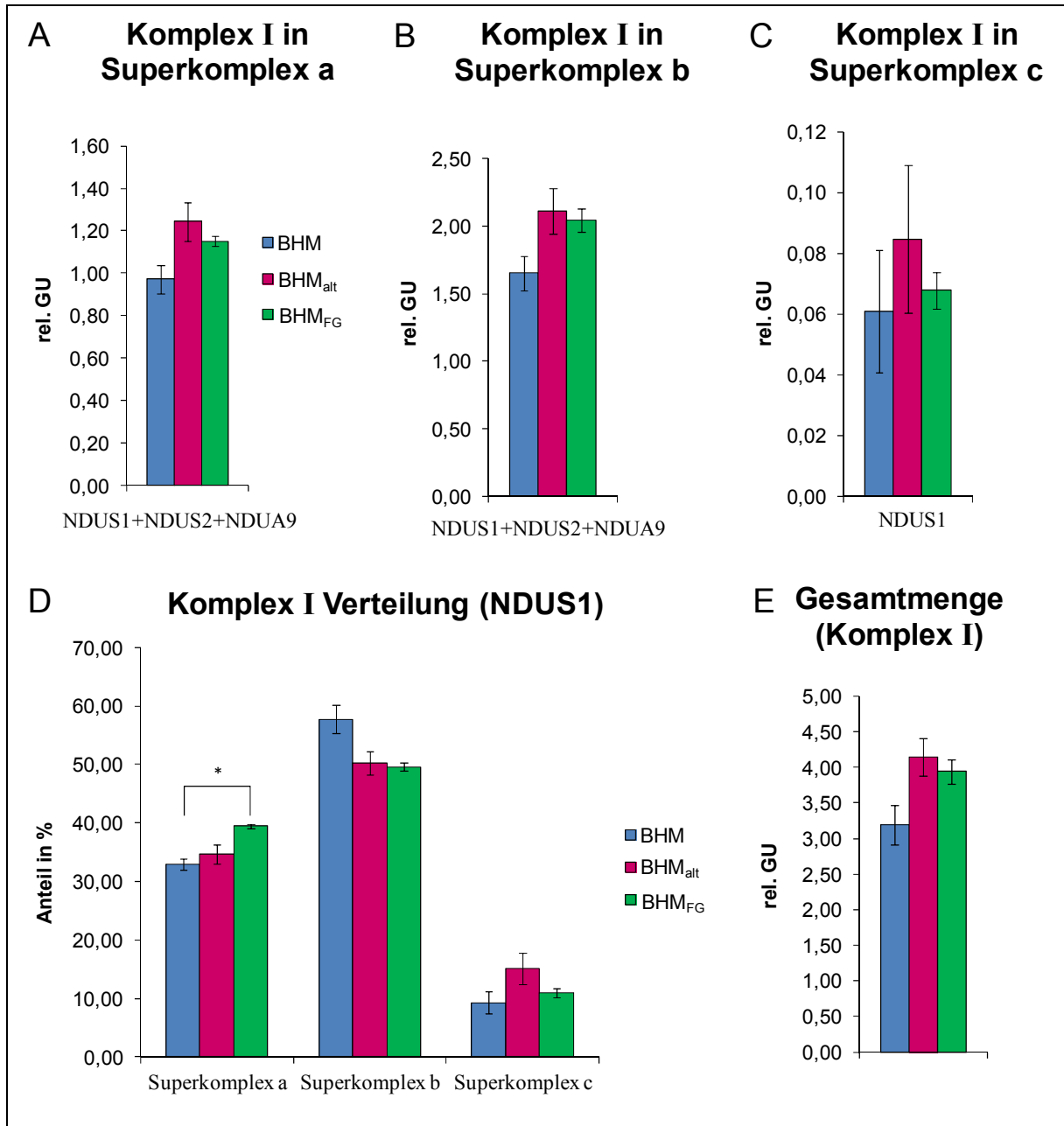


Abbildung 5.53: Proteinmengen der Untereinheiten für Komplex I in den Superkomplexen a, b und c (A-C, D), die prozentuale Verteilung der Untereinheit NDUS1 auf die Superkomplexe a, b und c (D) und die Gesamtproteinmenge (E) in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG}. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.12) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A:** bzw. **B:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten NDUS1, NDUS2 und NDUA9 in den Superkomplexen a und b. **C:** die Intensitäten der Graustufenwerte von NDUS1 für Komplex I in Superkomplex c. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Der schwarze Stern zeigt den Vergleich mit BHM (BHM vs BHM_{alt}, BHM vs BHM_{FG}).

Während im vorherigen Abschnitt bei Komplex V deutliche Unterschiede für BHM_{FG} zu sehen waren, liegen die Werte für Komplex I in den Superkomplexen in einem ähnlichen Bereich. In Abbildung 5.53 A ist die Gesamtproteinmenge für Superkomplex a dargestellt. Im Vergleich zu BHM besitzt BHM_{alt} eine 28 % (stat. n. sig.) höhere und BHM_{FG} eine um 21 % höhere Proteinmenge (stat. n. sig.). Ein ähnlicher Trend ist auch bei Superkomplex b und c zu beobachten, BHM_{alt} zeigt eine um 28 % (b) bzw. 39 % (c) höhere und BHM_{FG} eine um 18 % (b) bzw. 11 % (c) höhere Proteinmenge. Aufgrund der großen Fehlertoleranzen sind auch diese Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Dementsprechend ergibt sich für die Gesamtproteinmenge von Komplex I (Abbildung 5.53 E) in den Superkomplexen a, b und c im Vergleich zu BHM für BHM_{alt} eine um 28 % (stat. n. sig.) und für BHM_{FG} eine um 21 % (stat. n. sig.) höhere Proteinmenge.

Die prozentuale Verteilung der Untereinheit NDUS1 auf die Superkomplexe ist in Abbildung 5.53 D gezeigt. Bei allen Proben ist zu erkennen, dass Komplex I etwas mehr in Superkomplex b gebunden ist. Für BHM beträgt der Anteil 57 %, für BHM_{alt} und BHM_{FG} 50 %.

5.1.5.4.3 Komplex III

Wie in Abschnitt 5.1.5.3.3 werden für die Quantifizierung der Cytochrome-*c*-Oxidoreduktase in dem individuellen Komplex III₂ und den Superkomplexen a und b die mittels PMF bzw. Western Blot nachgewiesenen Untereinheiten QCR2, QCR7 und UCRI verwendet. Bei den Western Blots von BHM sei auf die Arbeit von Decker^[139] verwiesen.

Anhand von Abbildung 5.54 A ist zu erkennen, dass BHM_{FG} für den individuellen Komplex eine signifikant höhere Proteinmenge (um 18 %) im Vergleich zu BHM besitzt. Dagegen kann bei BHM_{alt} eine um 18 % (stat. sig.) verringerte Proteinmenge ermittelt werden. Ebenso ist für Superkomplex a zu beobachten, dass BHM_{FG} einen um 16 % höheren (stat. sig., Vgl. BHM) Graustufenwert besitzt. Für Superkomplex b zeigt BHM_{alt} die größte Proteinmenge (stat. n. sig.), bei BHM und BHM_{FG} sind die Werte nahezu identisch.

Bei der Verteilung der Untereinheiten QCR2, QCR7 und UCRI auf den individuellen Komplex III₂ und die Superkomplexe a und b ist derselbe Trend wie auch bei den anderen untersuchten Organismen (Reh, Schwein, Wildschwein und Maus) zu beobachten, der größte Teil entfällt auf den individuellen Komplex.

In Abbildung 5.54 E ist die Gesamtproteinmenge von Komplex III dargestellt. Es ist zu erkennen, dass BHM und BHM_{alt} identische Werte im Bereich 5,5 rel. GU besitzen. BHM_{FG} zeigt im Vergleich zu BHM eine um 13 % (stat. sig.) größere Proteinmenge.

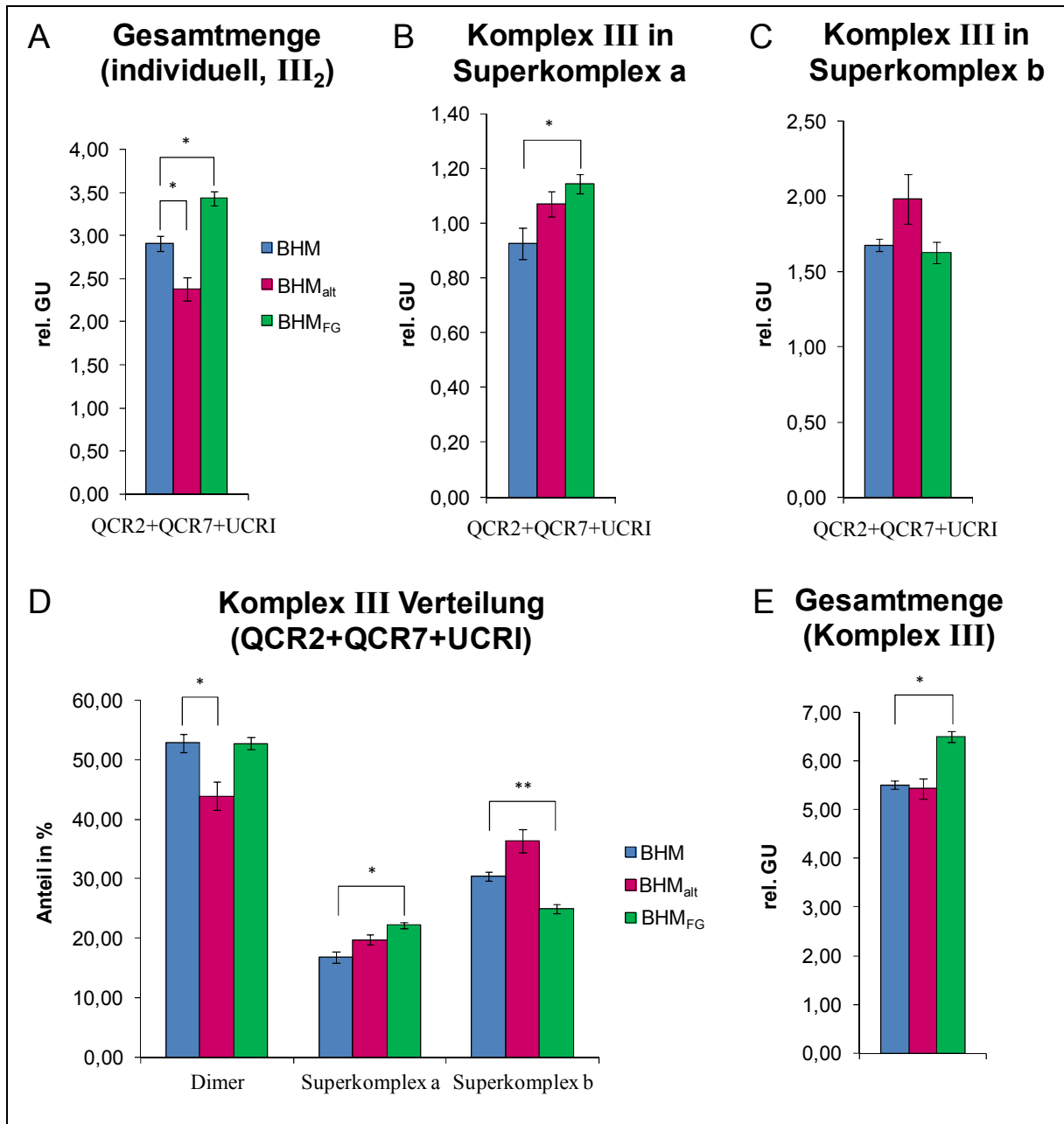


Abbildung 5.54: Proteinmengen der Untereinheiten für Komplex III in der individuellen Form (Dimer) und in den Superkomplexen a und b (A-C), die prozentuale Verteilung der Untereinheiten QCR2, QCR7, UCRI auf das Dimer und die Superkomplexe a und b (D) und die Gesamtproteinmenge (E) in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG}. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.11) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A-C:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten QCR2, QCR7 und UCRI in der individuellen Form (Dimer, III₂) und den Superkomplexen a und b. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs BHM_{alt}, BHM vs BHM_{FG}).

5.1.5.4.4 Komplex IV

Für den individuellen Komplex IV₁ von BHM wurden die Untereinheiten COX2, COX4I, COX5A und COX6B1 durch die Arbeiten von Kratochwil^[3] und Hunzinger *et al.*^[4] nachgewiesen. Die Untereinheit COX1 wurde gemäß den Western Blots von Decker^[139] dem individuellen Komplex IV₁, dem Dimer IV₂ und den Superkomplex III₂IV₁ zugeordnet.

Die summierten Intensitäten der Graustufenwerte von 5 Untereinheiten für den Komplex IV₁ sind in Abbildung 5.55 A gezeigt. BHM_{FG} besitzt mit Abstand die größte Proteinmenge im Bereich. Im Vergleich zu BHM entspricht dies einem Unterschied von 99 % (stat. sig.). Auch BHM_{alt} zeigt bei einem Vergleich mit BHM einen etwas höheren Wert, hierbei ist der Wert um 43 % größer (stat. sig.). Da für die Quantifizierung des Dimers IV₂ und des Superkomplexes III₂IV₁ nur die Untereinheit COX1 verwendet wurde, können die ermittelten Werte nur eine ungefähre Einschätzung über die Proteinmenge geben. Im Vergleich zu BHM zeigt BHM_{alt} für das Dimer eine um 37 % (stat. sig.) erhöhte Proteinmenge und BHM_{FG} eine um 65 % (stat. sig.) niedrigere Proteinmenge. Bei dem Superkomplex III₂IV₁ besitzt BHM_{alt} den mit Abstand höchsten Graustufenwert, der Unterschied zu BHM liegt bei 70 % (stat. sig.). Die relativen Graustufenwerte von BHM und BHM_{FG} liegen in einem ähnlichen Bereich, hierbei beträgt die Differenz 14 % (stat. n. sig.).

Die Gesamtproteinmenge von Komplex IV für BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG} ist in Abbildung 5.55 E dargestellt. Berücksichtigt man, dass für IV₂ und III₂IV₁ nur der Datensatz für COX1 ausgewertet worden ist, dann ist nachvollziehbar, dass das hier gezeigte Diagramm ungefähr die Ergebnisse für den individuellen Komplex IV₁ widerspiegelt. Im Vergleich zu BHM besitzt BHM_{FG} eine um 79 % größere und BHM_{alt} eine um 43 % größere Proteinmenge. In beiden Fällen sind die Unterschiede statistisch signifikant.

Für die prozentuale Verteilung auf den individuellen Komplex IV₁, das Dimer IV₂ und den Superkomplex III₂IV₁ (Abbildung 5.55 D) wurden nur die Daten von COX1 verwendet. BHM und BHM_{alt} zeigen sehr ähnliche Verhältnisse, 65 bis 68 % von Komplex IV liegen in individueller Form vor. Bei BHM_{FG} ist dieser Anteil sogar noch größer, hierbei entfallen 85 % auf IV₁.

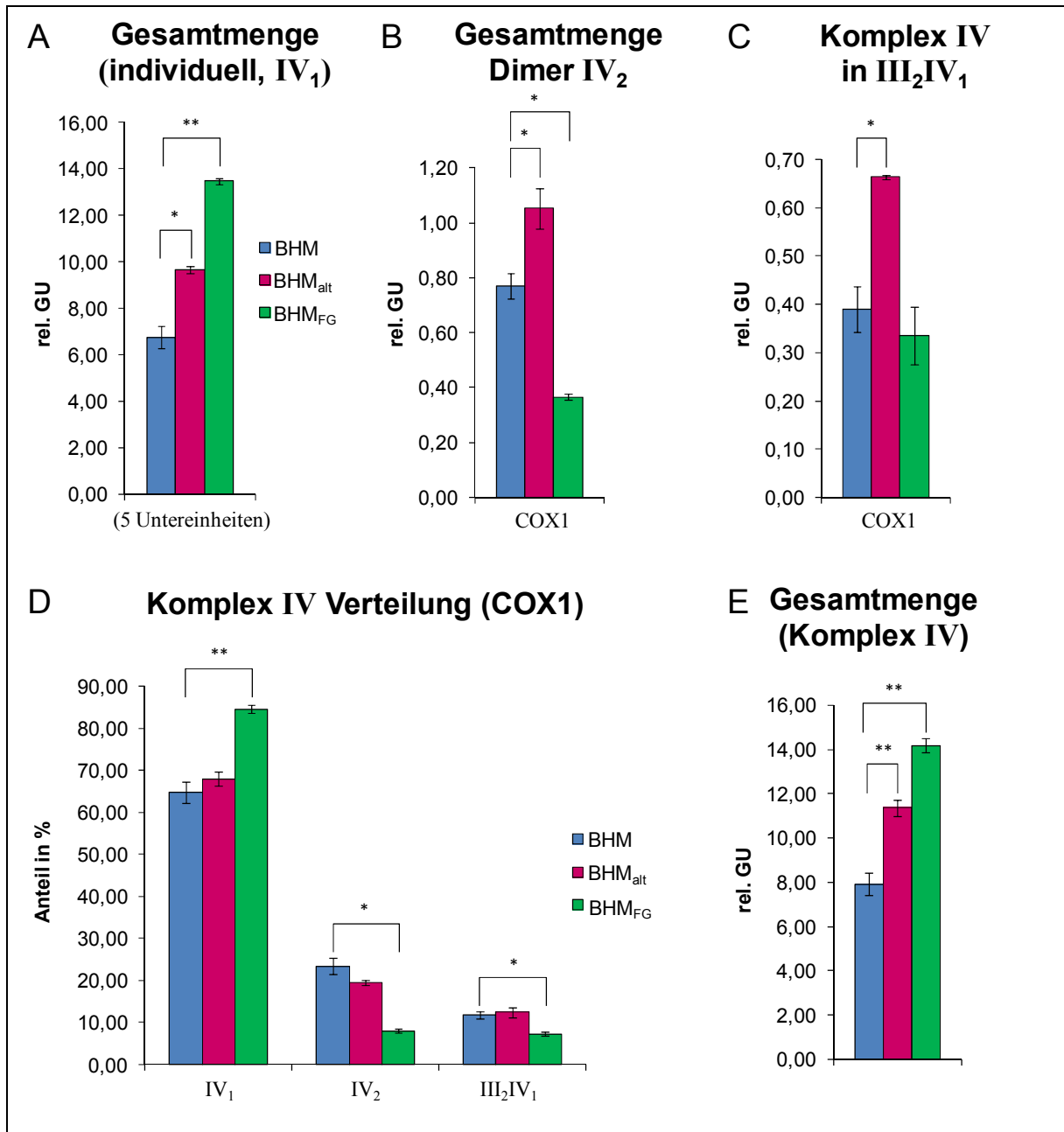


Abbildung 5.55: Proteinmengen der Untereinheiten für Komplex IV in der individuellen Form IV₁, in dimerer Form IV₂ und in dem Superkomplex III₂IV₁ (A-C), die prozentuale Verteilung der Untereinheit COX1 auf IV₁, IV₂ und III₂IV₁ (D) und die Gesamtproteinmenge (E) in den 2-D BN/SDS-Gelen von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG}. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.11) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt. **A:** die Intensitäten der Graustufenwerte der Untereinheiten COX1, COX2, COX41, COX5A und COX6B1 für den individuellen Komplex. **B, C:** die Intensität des Graustufenwertes der Untereinheit COX1 für das Dimer IV₂ und den Superkomplex III₂IV₁. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs BHM_{alt}, BHM vs BHM_{FG}).

5.1.5.4.5 Nicht-OxPhos-Proteine

Für die Quantifizierung von Nicht-OxPhos-Proteinen wurde ein Spot für das Hitzeschockprotein HSP60 und drei Spots für Proteine des Citratzyklus, die Aconitase, die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase und die Citrat-Synthase verwendet. Bei BHM_{alt} war keine eindeutige Zuordnung des Proteinspots für die Aconitase möglich, daher wird dieser Spot bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. In den Abschnitten 5.1.5.2.5 und 5.1.5.3.5 wurde zusätzlich ein Spot für das Trifunktionelle Enzym (β -Oxidation des Fettsäureabbaus) ausgewertet, allerdings konnte bei den 2-D Gelen von BHM_{alt} und BHM_{FG} dieser Spot ebenfalls nicht zweifelsfrei zugeordnet werden.

In Abbildung 5.56 A ist zu sehen, dass BHM_{alt} die größte Proteinmenge für HSP60 besitzt, BHM und BHM_{FG} zeigen nahezu identische Werte. Ebenso ist in Abbildung B zu erkennen, dass BHM_{alt} für die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase und die Citrat-Synthase die größte Proteinmenge besitzt. BHM und BHM_{FG} besitzen für die Aconitase und die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase wiederum sehr ähnliche Werte.

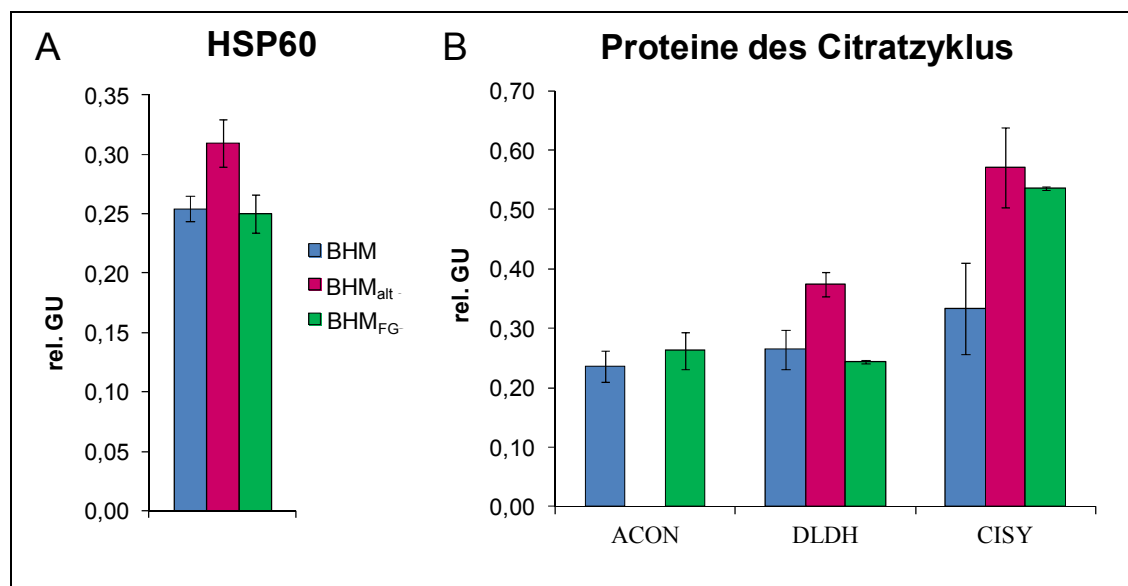


Abbildung 5.56: Proteinmengen der Untereinheiten für das Hitzeschockprotein HSP60 (A) und drei Proteine des Citratzyklus (B), die Aconitase (ACON), die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLDH) und die Citrat-Synthase (CISO) von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG}. Die für diese Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.9 und 8.11) gezeigt. Hier sind die Mittelwerte der Proteinmengen dieser technischen Replikate (n = 3) in relativen Graustufenwerten V% [rel. GU] dargestellt.

5.1.5.4.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die Proteinspots in 2-D BN/SDS-Gelen von unterschiedlichen Rinderherzmitochondrien quantitativ analysiert. Bei der Probe BHM_{alt} handelt es sich um isolierte Mitochondrien aus Rinderherzgewebe, dass seit November 2003 bei -80 °C gelagert wurde. Für BHM_{FG} wurde ein Rinderherz bei einem ortsansässigen Metzger beschafft. Das Herz wurde am Tag zuvor entnommen und nur bei -20 °C über Nacht gelagert, bis ich es am nächsten Tag abholen konnte.

Bereits in Abschnitt 5.1.2.4 konnte gezeigt werden, das BHM_{FG} im Vergleich zu BHM und BHM_{alt} im Bereich von Komplex V Monomer nur eine verschmierte Bande mit geringer Intensität besitzt. Auf den 2-D Gelen (Bsp. Abbildung 5.50) konnten nur bedingt Untereinheiten der ATP-Synthase zugeordnet werden. Im Bereich der oligomeren Formen (V₂, V₃ und V₄) besitzen die Untereinheiten α und β nur eine sehr geringe Intensität. Im Bereich des Monomers treten nebeneinander jeweils 2 Spotpaare der Untereinheiten α und β und weitere verschmierte Banden auf. Es könnte sich hierbei um Abbauprodukte der ATP-Synthase handeln. Da diese Spots allerdings sehr nahe aneinander liegen und demzufolge aus Proteinen stammen, die eine ähnliche Molmasse besitzen (BN-Gel, erste Dimension), trifft diese Erklärung wahrscheinlich nicht zu. Diese Resultate müssen sehr kritisch betrachtet werden, da es sich bei der Probe BHM_{FG} nur um ein biologisches Replikat handelt und keine genauen Information zur Krankheitsgeschichte des Tieres vorliegen. Daher müssten weitere Experimente durchgeführt und das Gewebe unter ähnlichen Bedingungen gelagert werden, um eine validierte Aussage zu treffen. Interessanterweise treten in Bezug auf die Proteinmenge von Komplex V bei BHM und BHM_{alt} nur kleine Unterschiede auf. Die Gesamtmenge an ATP-Synthase ist bei BHM_{alt} im Vergleich zu BHM größer und der Anteil an Monomer ist ebenso etwas höher.

Für Komplex I zeigen BHM_{alt} und BHM_{FG} bei der Gesamtproteinmenge etwas höhere Werte als BHM, bei der prozentualen Verteilung auf die Superkomplexe a, b und c liegen die Werte allerdings für alle Proben in einem ähnlichen Bereich. Für Komplex III besitzt nur BHM_{FG} eine höhere Proteinmenge als BHM_{alt} und BHM. Größere Unterschiede zwischen den Proben sind bei den Proteinmengen für Komplex IV zu erkennen. Betrachtet man die Gesamtproteinmenge, dann besitzt BHM_{FG} im Vergleich zu BHM einen fast doppelt so hohen (Faktor 1,79) und BHM_{alt} eine um den Faktor 1,43 höheren Wert. Des Weiteren fällt auf, dass bei BHM_{FG} im Vergleich zu BHM und BHM_{alt} ein deutlich größerer Anteil von Komplex IV in individueller Form vorliegt und auf Dimer IV₂ und den Superkomplex III₂IV₁ nur jeweils 10 % entfallen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwischen BHM und BHM_{alt} nur kleine Unterschiede in den Proteinmengen der Atmungskettenkomplexe und deren Verteilung in den Superkomplexen auftreten. Die lange Lagerung des Gewebes (BHM_{alt}) bei -80 °C scheint demzufolge keinen großen Effekt auf die OxPhos-Komplexe zu haben. Dafür spricht ebenfalls, dass die den Aktivitätstests für Komplex I und IV (5.1.2.4) die spezifischen

Aktivitäten der individuellen Komplexe und der Superkomplexe beider Proben in einem ähnlichen Bereich liegen.

5.1.6 Quantitativer In-Gel Hydrolyse-Aktivitätstest für Komplex V

Die ATP-Synthase, Komplex V der mitochondrialen Atmungskette, ist für die Produktion des Energieträgers ATP in fast allen Organismen verantwortlich. Hierbei nutzt die ATP-Synthase einen elektrochemischen Protonengradient, der von den Komplexen I, III und IV aufgebaut wird^[215]. Die ADP/ATP-Translokase und das Phosphatcarrierprotein sind für den Transport der für die Synthese benötigten Edukte ADP und Phosphat und den Abtransport des gebildeten ATPs aus dem Mitochondrium zuständig^[195, 196].

Wie bereits in anderen Abschnitten erwähnt, liegt Komplex V nicht nur in monomerer Form vor, sondern bildet auch homooligomere Strukturen (Dimere, Trimere, Tetramere) aus. Reifschneider^[94] konnte zeigen, dass die Proteinmenge dieser Oligomere abhängig von Gewebe und Organismus deutlich unterschiedlich ist. Die genaue Funktion dieser Oligomerisierung ist bisher noch nicht vollständig geklärt, Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass diese Assemblierungen an der Ausbildung der Krümmung der Cristae beteiligt sind^[11, 71, 73]. Komplex V ist aber nicht nur in der Lage ATP zu synthetisieren, sondern kann unter auch die umgekehrte Reaktion, die Hydrolyse zu ADP und Phosphat, katalysieren. Die Arbeiten von Krause *et al.*^[64, 88] und Suhai *et al.*^[138] haben gezeigt, dass diese Reaktion unter einfachen präparativen Bedingungen nachgewiesen werden kann. Nach der Solubilisierung der OxPhos-Komplexe und einer nativen Elektrophorese wird das Gel in einer Lösung inkubiert, die ATP und Bleinitrat enthält (Abschnitt 4.8.3). Bei der Hydrolyse frei werdendes Phosphat reagiert mit Bleinitrat zu schwerlöslichem Bleiphosphat, das als weißes Präzipitat auf den Proteinbanden ausfällt.

5.1.6.1 Optimierung

Die Optimierung des In-Gel Hydrolyse-Aktivitätstests von Komplex V wurde von Olga Ankudin^[89] und mir durchgeführt. Für erste Versuche wurden Solubilisate aus Rinderherzmitochondrien (Digitonin/Protein-Verhältnis 3 g/g, 140 µg Protein, vor Solub.) mittels BN-PAGE (T = 4 - 13 %, C = 3 %) getrennt und der Aktivitätstest, wie in Abschnitt 4.8.3 beschrieben, durchgeführt. Erst nach einer Inkubation für 60 Minuten konnten die ersten Banden für den individuellen Komplex V₁ visuell wahrgenommen werden. Banden für das Dimer zeigten sich erst nach 2 Stunden und für höhere Oligomere nach 16 Stunden (Abbildung 5.57 B). Darüber hinaus war zu beobachten, dass sich die Aktivitätstest-Lösung blau färbte, dies ist auf den bei der BN-Page verwendenden Farbstoff Coomassie zurückzuführen. Einen Grund dafür, dass die Hydrolyse-Reaktion unter diesen Bedingungen sehr langsam abläuft, kann bei Krause *et al.*^[64] gefunden werden. Der Farbstoff Coomassie-Blau beeinträchtigt durch die Bindung an Proteine die Zugänglichkeit des Substrats und die Detektion der aktiven Banden auf dem Gel. Weitere Nachteile des Farbstoffes Coomassie bestehen darin, dass es bei höheren Konzentrationen zu einer Destabilisierung der höheren Oligomere der ATP-Synthase^[216] und zu einer Dissoziation des Monomers V₁ in den

membranintegralen Teil F_0 und den hydrophilen Kopfteil F_1 führt^[217]. Auch eine Wiederholung des BN-Gellaufs mit einer reduzierten Menge an Coomassie im Kathodenpuffer brachte nur geringfügige Verbesserungen.

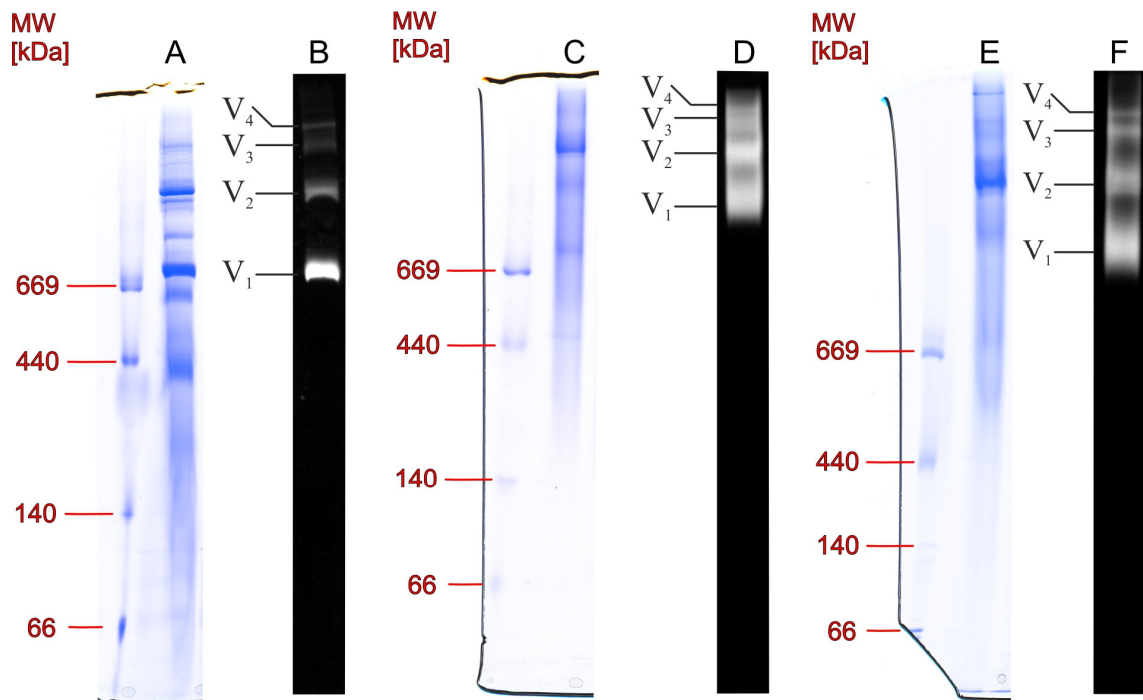


Abbildung 5.57: In-Gel Hydrolyse-Aktivitätstest für Komplex V von BHM unter Verwendung von BN- und CN-PAGE. Es wurden pro Spur (A-F) jeweils 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM verwendet. Als Proteinmassenstandard wurden 4 µL des HMW-Markers (rot) auf das entsprechende Gel gegeben. Coomassie-gefärbtes Gel: **A** = BN-Gel (T = 4 - 13 %, C = 3 %), **C** = CN-Gel (T = 4 - 13 %, C = 3 %), **E** = CN-Gel (T = 4 - 9 %, C = 3 %). Hydrolyse-Aktivitätstest für Komplex V: **B** = BN-Gel nach 16 Stunden Inkubation, **D** = CN-Gel (T = 4 - 13 %) nach 2 Stunden Inkubation, **F** = CN-Gel (T = 4 - 9 %) nach 2 Stunden Inkubation. Die hier gezeigten Gele wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] hergestellt.

Daher wurde für weitere Experimente die farblos-native Elektrophorese (CN-PAGE) verwendet. In der hier eingesetzten Variante (siehe 4.6.1) wurde den Gellösungen für das Gradientengel das Detergens Digitonin (0,01 % (w/v)) zugesetzt, um eine Aggregation der hydrophoben Membranproteine zu verhindern^[86]. Als Probe wurde BHM (140 µg, 3 g/g) und ein CN-Gradientengel mit einer Totalacrylamidkonzentration T = 4 - 13 % verwendet. Nach Inkubation in der Aktivitätstest-Lösung konnte die erste Bande für das Monomer der ATP-Synthase V_1 bereits nach wenigen Minuten gesehen werden. Nach ca. 15 Minuten traten Banden im Bereich des Dimers V_2 und nach ca. 30 Minuten Banden für das Trimer V_3 und das Tetramer V_4 auf. In Abbildung 5.57 D ist der Hydrolyse-Aktivitätstest für BHM nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Banden im CN-Gel im Vergleich zum BN-Gel weiter in den hoch molekularen Bereich verschoben sind und dementsprechend der Abstand zwischen den Banden geringer ist. Dies erschwert besonders für V_3 und V_4 eine eindeutige Zuordnung. Des Weiteren sind die Banden im CN-Gel deutlich diffuser. Um eine bessere Auflösung der Banden zu erhalten, wurden Versuche mit

unterschiedlichen Acrylamidgradienten durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Acrylamidkonzentration von $T = 4 - 9 \%$ zu einer besseren Trennung der Proteinbanden führt (Abbildung 5.57 F).

5.1.6.2 Quantitative Auswertung

Für eine quantitative Auswertung des In-Gel Hydrolyse-Aktivitätstests von Komplex V wird wie in Abschnitt 4.8.3 vorgegangen. Nach beendeter Elektrophorese wird das CN-Gel in einer Färberschale mit Aktivitätstest-Lösung unter Schütteln inkubiert und zu festgelegten Zeitpunkten wird mit dem CCD-Kamerasystem LAS-3000 (bei eingeschaltetem weißen Licht ohne Filter, Blendenzahl $F = 2,8$) ein 16-bit Graustufenbild aufgenommen. In der ersten Stunde wird das Gel alle 10 Minuten eingescannt, während der 2. Stunde alle 15 Minuten, während der 3. Stunde alle 30 Minuten und danach alle 60 Minuten. Um zu überprüfen, ob die enzymatische Reaktion ihren Sättigungsbereich erreicht hat, wird das Gel für weitere 14 Stunden in der Aktivitätstest-Lösung inkubiert. Durch Zugabe der Stopp-Lösung wird die Reaktion beendet und das Gel für weitere 60 Minuten in dest. H_2O inkubiert.

Wie schon bei dem Aktivitätstest für Komplex I (5.1.3.1, Abbildung 5.6) gezeigt, kann die Zunahme des Präzipitat durch eine Zunahme des Graustufenwertes gemessen werden. Alle aufgenommen Graustufenbilder werden anschließend mit der Software Delta 2D ausgewertet. Für die weitere Auswertung wird wie in Abschnitt 4.11.3 vorgegangen. Nachdem die Graustufenwerte für jeden Zeitpunkt ermittelt worden sind, wird die Menge an Präzipitat zum Zeitpunkt $t = 0$ von jedem Wert abgezogen. Anschließend findet eine Normierung auf die Proteinmenge des entsprechenden Komplexes in der Bande auf dem nativen Gel statt. Im Gegensatz zu den Aktivitätstests in BN-Gelen ist bei einem CN-Gel keine eindeutige Zuordnung der Oligomere der ATP-Synthase möglich. Wie in den Coomassie-gefärbten Gelen in Abbildung 5.57 zu erkennen ist, kommt es aufgrund des unterschiedlichen elektrophoretischen Laufverhaltens in CN-Gelen im Bereich des Dimers zu einer Überlagerung mit dem Superkomplexen a, b und c. Ebenso gestaltet sich eine Zuordnung der Banden für das Trimer und Tetramer im höher molekularen Bereich schwierig. Daher werden jeweils zusätzliche CN-Gelspuren der Proben (3 technische Replikate) für eine 2-D SDS-Elektrophorese verwendet. Die 2-D Gele werden mit Sypro[®] Ruby gefärbt und anschließend wie in Abschnitt 4.11.1 beschrieben mit Delta 2D ausgewertet. Für die Hydrolyse von ATP sind nur die Untereinheiten α und β des hydrophilen F_1 -Kopfteils der ATP-Synthase verantwortlich^[146]. Deshalb wird die Summe der relativen Graustufenwerte dieser Untereinheiten näherungsweise als Proteinmenge den entsprechenden Komplexen V_1 , V_2 , V_3 und V_4 zugeordnet. In Abbildung 5.58 ist ein 2-D CN/SDS-Gel von BHM dargestellt. Die Untereinheiten α und β der Assemblierungen von Komplex V sind blau markiert.

Ähnlich der quantitativen Auswertung eines Komplex-IV-Aktivitätstests wird auch bei dem Aktivitätstest von Komplex V eine weitere Normierung auf die Anzahl der an der Hydrolyse beteiligten Kopien der ATP-Synthase vorgenommen (Normierungsfaktor F_2). Beispielsweise bedeutet dies für das Dimer, dass die Werte durch den Faktor 2 geteilt werden müssen.

Nachdem die Graustufenwerte (Grey Unit normiert, GU_{normiert}) wie beschrieben normiert worden sind, werden sie gegen die Zeit aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Die Steigung dieser Geraden stellt die relative spezifische Aktivität der entsprechenden Proteinbande in der Einheit GU_{normiert} pro Minute dar.

Von allen untersuchten Proben werden jeweils sechs technische Replikate ($n = 6$, aus der gleichen Solubilisierung) auf ein CN-Gel aufgetragen. Drei Replikate werden für den Aktivitätstest, die anderen für 2-D SDS Gele verwendet. Aus den erhaltenen relativen spezifischen Aktivitäten der Replikate werden die Mittelwerte berechnet und als Balkendiagramme dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler dar. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: $*$ = $p < 0,05$; $**$ = $p < 0,01$. Ein statistisch signifikanter Unterschied wird mit stat. sig. abgekürzt, ein nicht signifikanter Unterschied mit stat. n. sig..

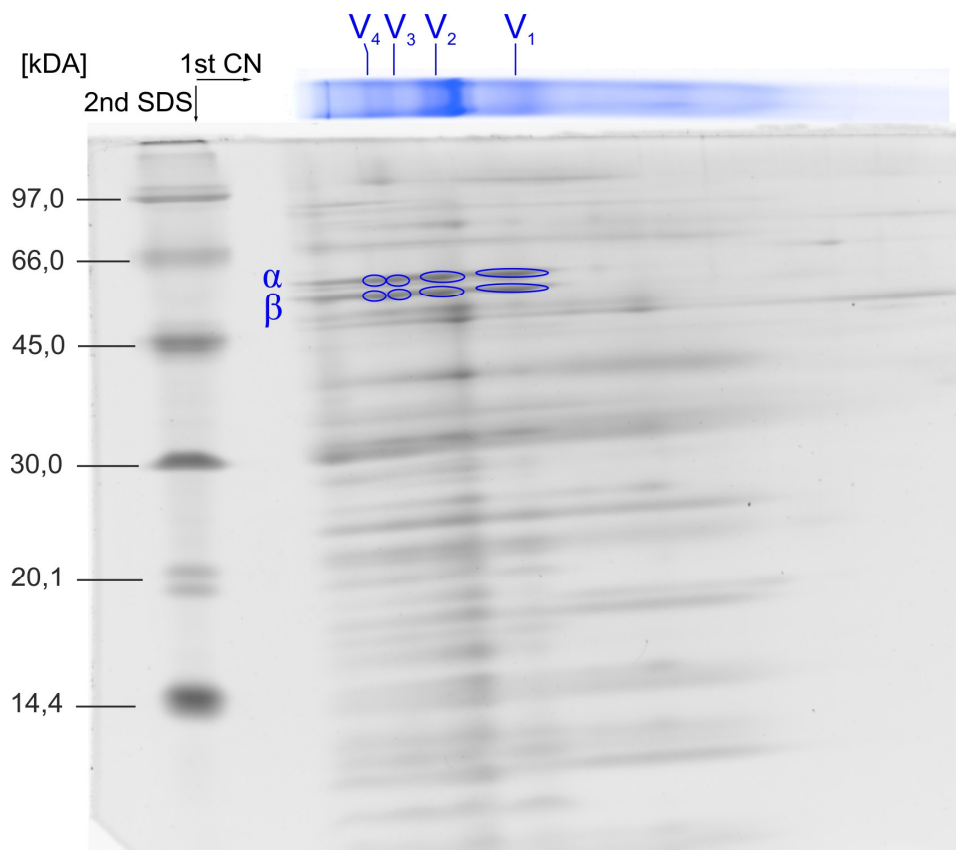


Abbildung 5.58: Sypro® Ruby-gefärbte 2-D BN/SDS-Gele von BHM. Es wurden 140 μg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Ein mit Coomassie gefärbter CN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links). Die Untereinheiten α und β des Monomers V_1 , des Dimers V_2 , des Trimers V_3 und des Tetramers V_4 sind blau markiert.

5.1.6.3 Herzmitochondrien aus Rind, Reh, Schwein und Wildschwein

BHM, DHM, PHM und WHM wurden mittels CN-PAGE (T = 4 - 9 %, C = 3 %) aufgetrennt. Es wurden pro Spur jeweils 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von den Proben aufgetragen. Ein Coomassie-gefärbtes CN-Gel ist in Abbildung 5.59 A gezeigt. Bei dem In-Gel Aktivitätstest für Komplex V (Abbildung 5.59 B) handelt es sich um ein zusammengesetztes Gel, das vollständige Gel ist im Anhang (Abbildung 8.13 A) dargestellt. Für den Aktivitätstest wurden pro Probe jeweils drei technische Replikate (gleiche Solubilisierung) verwendet.

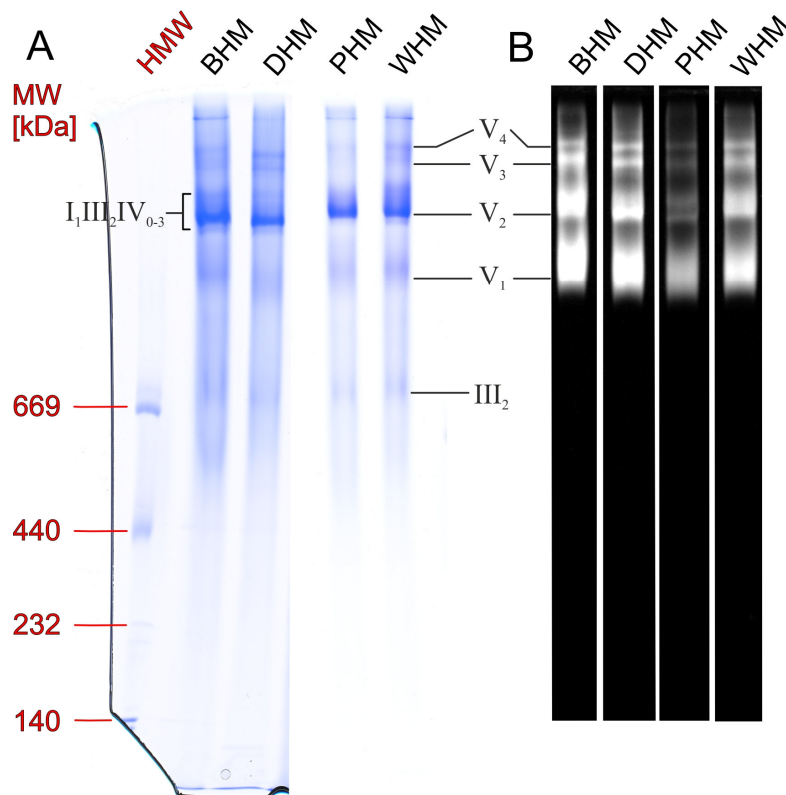


Abbildung 5.59: Coomassie-gefärbtes CN-Gel (A) und Hydrolyse-Aktivitätstest für Komplex V in einem CN-Gel (B) von BHM, DHM, PHM und WHM. Es wurden pro Spur jeweils 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM, DHM, PHM und WHM auf ein großes CN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 9 %, C = 3 %) aufgetragen. Als Proteinmassenstandard wurden 4 µL des HMW-Markers (rot) auf das Gel aufgetragen (links). Es handelt sich bei dem dargestellten Aktivitätstest um ein zusammengesetztes Gel, das vollständige Gel ist im Anhang (**Abbildung 8.13 A**) dargestellt. Da die Superkomplex a bis d nicht eindeutig zugeordnet werden können, wird nur der Bereich mit I₁III₂IV₀₋₃ markiert.

Die Zuordnung der Proteinbanden erfolgt nach Wittig *et al.*^[87, 137, 218] und Krause *et al.*^[64, 88]. Wie bereits in Abschnitt 5.1.6.1 zu sehen war, besitzen die OxPhos-Komplexe in CN-Gelen eine anderes elektrophoretisches Laufverhalten in Vergleich zu BN-Gelen. Dies ist auch bei den Proben aus Rinder-, Reh-, Schwein- und Wildschweinherz zu sehen. Alle Proben zeigen ein sehr ähnliches Bandenmuster. Im oberen Bereich des Gels ist eine Bande mit hoher Intensität zu erkennen, hierbei handelt es sich sowohl um das mitochondriale Dimer der ATP-Synthase V₂ als auch um Superkomplex b. Die darüber liegenden Banden, wahrscheinlich

Superkomplex c und d, sind sehr diffus und besitzen nur einen geringen Abstand zueinander. Auch die Bande für den individuellen Komplex V_1 ist leicht verschmiert, die Bande für den individuellen Komplex III_2 besitzt nur eine geringe Intensität. Des Weiteren sind im unteren Bereich des Gels keine Banden für den individuellen Komplex IV_1 bzw. Assemblierungen aus III_2 und IV zu finden. Dies deutet darauf hin, dass die OxPhos-Komplexe fast ausschließlich in Form von Superkomplexen vorliegen^[64].

In Abbildung 5.59 B ist der Hydrolyse-Aktivitätstest für BHM, DHM, PHM und WHM dargestellt. Es können das Monomer V_1 und höhere Oligomere (V_{2-4}) der ATP-Synthase zugeordnet werden. Es fällt auf, dass bei dem Monomer die größte Menge an weißem Bleiphosphat (Präzipitat) zu finden ist. Das Dimer besitzt eine geringere Menge an Präzipitat, Trimer und Tetamere zeigen beide eine ähnlich schwache Färbung. Vergleich man die Menge an gebildeten Präzipitat zwischen den Proben, so ist zu erkennen, dass PHM die mit Abstand geringste Intensität besitzt, BHM, DHM und WHM zeigen sehr ähnliche Intensitäten.

Für die quantitative Auswertung dieses Hydrolyse-Tests wurde, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, vorgegangen. Für die 2-D CN/SDS-Gele wurden jeweils 3 technische Replikate von Solubilisaten (140 µg, vor Solub., 3 g/g) aus BHM, DHM, PHM und WHM verwendet. Die entsprechenden 2-D Gele sind im Anhang (Abbildung 8.14 und 8.15) zu finden. In Abbildung 5.60 sind die berechneten relativen spezifischen Hydrolyse-Aktivitäten gezeigt. Es handelt sich hierbei bereits um die normierten Werte. Für das Monomer V_1 der ATP-Synthase ist zu sehen, dass die Proben aus DHM die höchste spezifische Aktivität besitzen (stat. n. sig.). PHM zeigt eine deutlich niedrigere Hydrolyse-Aktivität, im Vergleich zu BHM um den Faktor 0,62 (stat. sig.). Bei einem Vergleich der Proben aus Schwein und Wildschwein ist zu erkennen, dass WHM eine fast doppelt so hohe Aktivität besitzt (Faktor 1,95, stat. sig.). Für das Dimer V_2 zeigen DHM und BHM wiederum sehr ähnliche Aktivitäten. PHM besitzt mit Abstand die niedrigste Aktivität, im Vergleich zu BHM beträgt der Unterschied 91 % und im Vergleich zu WHM 87 % (in beiden Fällen stat. sig.). WHM besitzt einen um den Faktor 0,25 niedrigeren Wert (Vgl. BHM, stat. n. sig.). Für die Oligomere V_3 und V_4 der ATP-Synthase ist bei der Verteilung der spezifischen Aktivitäten ein ähnlicher Trend wie beim Monomer zu beobachten. DHM zeigt die höchste spezifische Hydrolyse-Aktivität, im Vergleich zu BHM um den Faktor 1,45 höher (Mittelwert, in beiden Fällen stat. sig.). PHM besitzt für das Trimer und Tetramer eine um 0,80-fach niedrigere Aktivität (Vgl. BHM, in beiden Fällen stat. sig.).

Vergleicht man die relative spezifische Aktivität des Monomers mit den Aktivitäten der Oligomere, dann ist zu erkennen, dass bei den untersuchten Proben (Abbildung 5.60 A) das Monomer die höchste Aktivität besitzt. Mit steigendem Assemblierungsgrad sinkt die Aktivität des betrachteten Oligomers. Bei den im Folgenden dargestellten Werte handelt es sich um Mittelwerte von BHM, DHM und WHM. Dementsprechend ergeben sich für diese Proben folgende Abnahmen in der spezifischen Aktivität (im Vergleich zum Monomer): Bei dem Dimer um den Faktor 0,51, bei dem Trimer um den Faktor 0,38 und bei dem Tetramer um den Faktor 0,83.

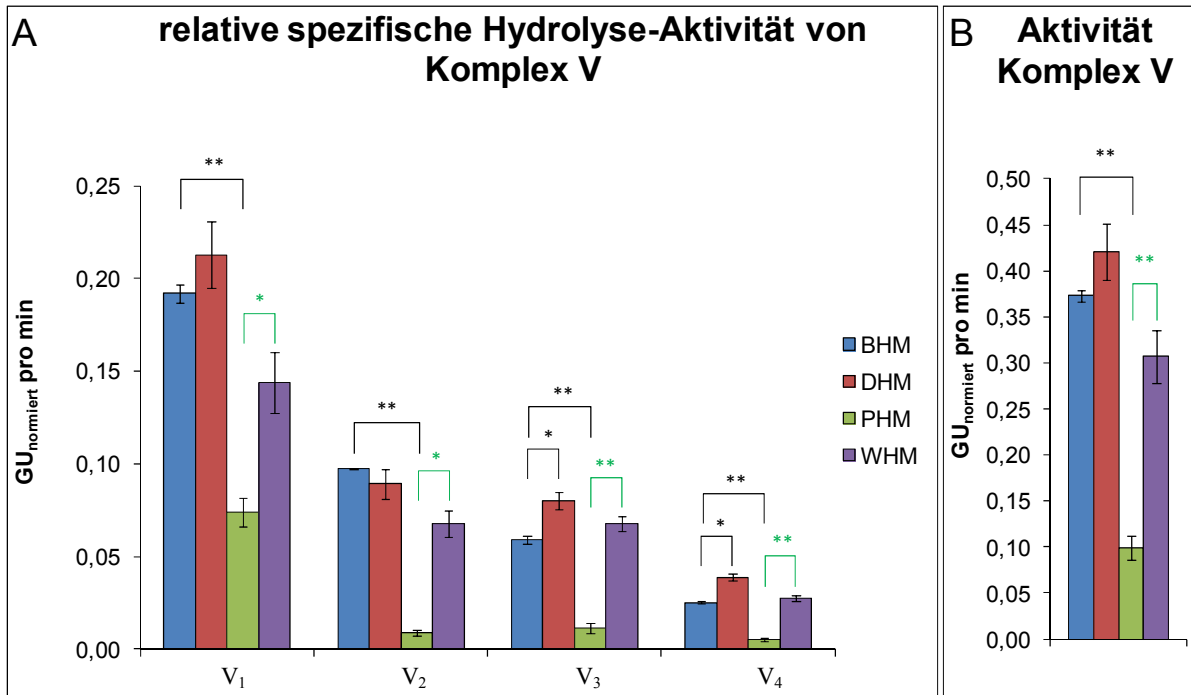


Abbildung 5.60: relative spezifische Hydrolyse-Aktivitäten des Monomers V₁, Dimers V₂, Trimers V₃ und Tetramers V₄ der ATP-Synthase (A) und die Gesamtaktivität von Komplex V (B) von BHM, DHM, PHM und WHM. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang (Abbildung 8.13 A). Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der spezifischen Aktivitäten in Graustufenwerten pro Minute (GU_{normiert} pro min). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM), grüne Sterne zeigen den Vergleich zwischen PHM und WHM.

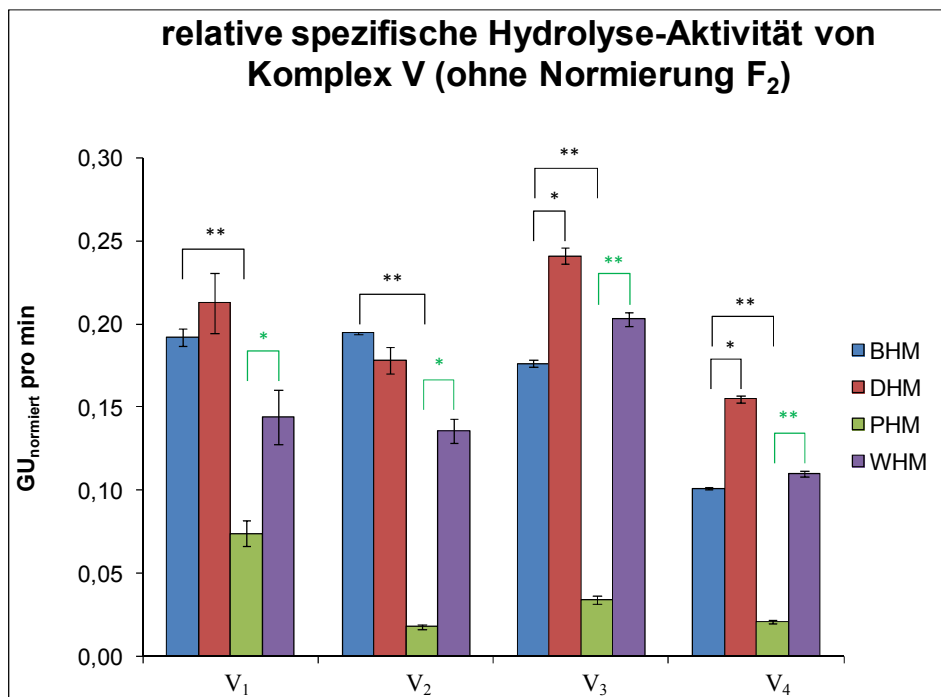


Abbildung 5.61: relative spezifische Hydrolyse-Aktivitäten des Monomers V₁, Dimers V₂, Trimers V₃ und Tetramers V₄ der ATP-Synthase (ohne den Normierungsfaktor F₂). Weitere Angaben sind identisch mit Abbildung 5.60.

Da PHM sich deutlich von den anderen Proben unterscheidet, wird es separat betrachtet. Hier ist zu erkennen, dass die Oligomere von Komplex V eine deutlich niedrigere Hydrolyse-Aktivität besitzen als das Monomer. Im Vergleich zu V₁ zeigt V₂ eine um den Faktor 0,88, V₃ um den Faktor 0,85 und V₄ um den Faktor 0,93 niedrigere Aktivität.

Entgegen den hier gezeigten Ergebnissen haben Krause *et al.*^[64] gezeigt, dass die ATP-Synthase sowohl für das Monomer als auch für die Oligomere ähnliche Hydrolyse-Aktivitäten besitzen. Es wurden die OxPhos-Komplexe aus Rinderherzmitochondrien (Detergens/Protein-Verhältnis 4g/g) mittels CN-PAGE aufgetrennt und In-Gel Aktivitätstest durchgeführt. Ähnliche Resultate wurden auch von Meyer *et al.*^[219] gefunden, sie untersuchten ebenfalls die Hydrolyse-Aktivität der ATP-Synthase aus BHM. Wie kommen diese im Vergleich zu den hier gezeigten Daten sehr unterschiedlichen Ergebnisse zustande. Nach genauer Durchsicht beider Veröffentlichungen konnte nicht herausgefunden werden, wie die Normierung der berechneten Aktivitäten durchgeführt worden ist. Wahrscheinlich wurde nicht auf die Anzahl der im Oligomer enthaltenen ATP-Synthasen normiert. Wird der dafür eingeführte Normierungsfaktor F₂ (Abschnitt 4.11.3) vernachlässigt, ergibt sich das in Abbildung 5.61 gezeigte Diagramm. Bei BHM, DHM und WHM ist zu erkennen, dass das Monomer, Dimer und Trimer in grober Näherung ähnliche Werte für die Hydrolyse-Aktivität besitzen.

Die Gesamtaktivität von Komplex V (ausgehend von den normierten Aktivitäten) ist in Abbildung 5.60 B dargestellt. DHM zeigt wiederum die höchste spezifische Aktivität für die Hydrolyse von ATP, während PHM die niedrigste Aktivität besitzt. Im Vergleich zu BHM bedeutet dies für DHM eine um den Faktor 1,13 höhere Aktivität (stat. n. sig.) und für PHM eine deutlich niedrigere Aktivität (Faktor 0,73, stat. sig.). Vergleicht man auch hier die Proben aus Schwein und Wildschwein, so ist zu erkennen, dass PHM eine um den Faktor 0,68 niedrigere Aktivität besitzt.

Phillips *et al.*^[162] untersuche die Hydrolyse-Aktivität von Herzmitochondrien aus Schwein, Hase und Maus in BN- und CN-Gelen. Die OxPhos-Komplexe wurden mit dem Detergens DDM solubilisiert, die Auswertung erfolgte ähnlich wie hier beschrieben densitometrisch. Es konnte gezeigt werden, dass die ATP-Synthase aus Schwein die mit Abstand niedrigste Aktivität besitzt. Komplex V aus Hase zeigt eine um den Faktor 2,8 bzw. aus Maus eine um den Faktor 4,0 höhere Aktivität.

Für eine quantitative Auswertung eines Aktivitätstests von Komplex V wird, wie in Abschnitt 5.1.6.2 beschrieben, die Proteinmenge von V₁, V₂, V₃ und V₄ über die Untereinheiten α und β in 2-D CN/SDS-Gelen ermittelt. In Abbildung 5.62 ist eine prozentuale Verteilung der ATP-Synthase dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei DHM, PHM und WHM der Anteil von Monomer an der Gesamtproteinmenge von Komplex V in einem Bereich von 45 % liegt. Bei BHM ist dieser Wert sogar noch etwas niedriger, es entfallen auf das Monomer 39 %. Das bedeutet, dass mehr als 50 % der ATP-Synthase in CN-Gelen in oligomerer Form vorliegt. Im Vergleich dazu sei auf die prozentuale Verteilung in 2-D BN/SDS-Gelen in Abbildung 5.36 (Seite 111) verwiesen. Unter diesen Bedingungen betrug der Anteil des Monomers der ATP-Synthase bei BHM 61 %, bei DHM 64 %, bei PHM 74 % und bei WHM 70 %.

Dementsprechend entfielen auf die Oligomere bei BHM der höchste Anteil mit 39 % und bei PHM der niedrigste mit 26 %.

Für die Untersuchung der Oligomere der ATP-Synthase stellt damit die CN-PAGE im Vergleich zur BN-PAGE die mildere Methode dar. Die Veröffentlichungen von Wittig *et al.*^[87, 137], Krause *et al.*^[64, 220] und Dencher *et al.*^[221] bestätigen dies. Krause *et al.*^[64] konnten in 2-D CN/SDS-Gelen von Rinderherzmitochondrien nachweisen, dass mehr als 75 % der ATP-Synthase in oligomerer Form vorliegen, davon entfallen 35 bis 40 % auf das Trimer V₃ und das Tetramer V₄. Interessanterweise konnten auch die Komplexe I, III und IV fast ausschließlich in den Superkomplexen a bis d gefunden werden.

Des Weiteren konnten für den filamentösen Pilz *Podospora anserina* gezeigt werden^[220], dass in CN-Gelen Komplex V nur in dimerer Form zu finden ist, während in BN-Gelen Monomer zu Dimer in gleichem Verhältnis vorliegen. Bei der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* liegt die mitochondriale ATP-Synthase sowohl bei BN- als auch bei CN-PAGE nur als Dimer vor^[83, 133, 222]. Allerdings muss man sich auch der Nachteile dieser Methode bewusst sein, eine geringere Bandenschärfe und aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität der OxPhos-Komplexe kommt es zu einer Überlagerung der Superkomplexe und der oligomeren Formen von Komplex V.

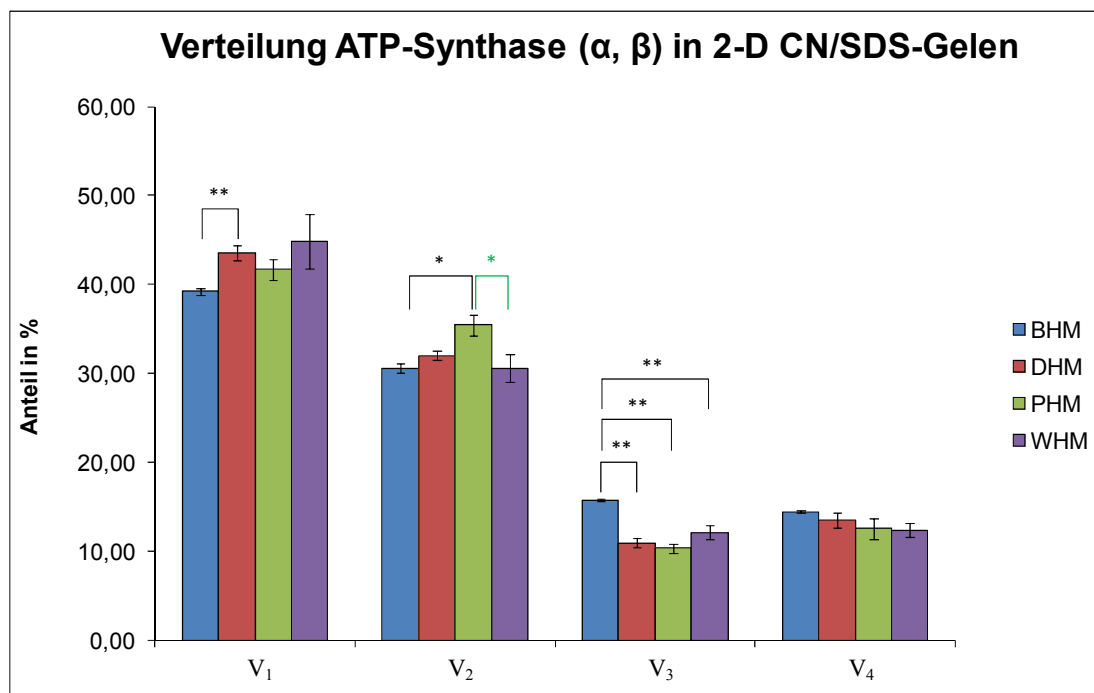


Abbildung 5.62: prozentuale Verteilung der ATP-Synthase (Untereinheiten α und β) als Monomer V₁, Dimer V₂, Trimer V₃ und Tetramer V₄ in 2-D CN/SDS-Gelen von BHM, DHM, PHM und WHM. Die für die Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.14 und 8.15) gezeigt. Die Signifikanzniveaus sind Abbildung 5.60 zu entnehmen. Schwarze Sterne zeigen den Vergleich mit BHM (BHM vs DHM, BHM vs PHM, BHM vs WHM), der grüne Stern zeigt den Vergleich zwischen PHM und WHM.

5.1.6.4 Herzmitochondrien aus Maus und Ratte (Wistar und Fischer)

Die mitochondrialen OxPhos-Komplexe aus Mäuse- und Rattenherz (Wistar und Fischer) wurden mittels CN-PAGE (T = 4 - 9 %, C = 3 %) aufgetrennt. Es wurden pro Spur jeweils 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g für R_FHM und R_WHM, 4 g/g für MHM) von den Proben aufgetragen. In Abbildung 5.63 A ist ein Coomassie-gefärbtes CN-Gel und in Abbildung B ein Ausschnitt des In-Gel Hydrolyse-Aktivitätstests von Komplex V dargestellt. Das vollständige Gel des Aktivitätstest ist im Anhang (Abbildung 8.13 B) gezeigt, für den Test wurden pro Probe jeweils drei technische Replikate (gleiche Solubilisierung) verwendet.

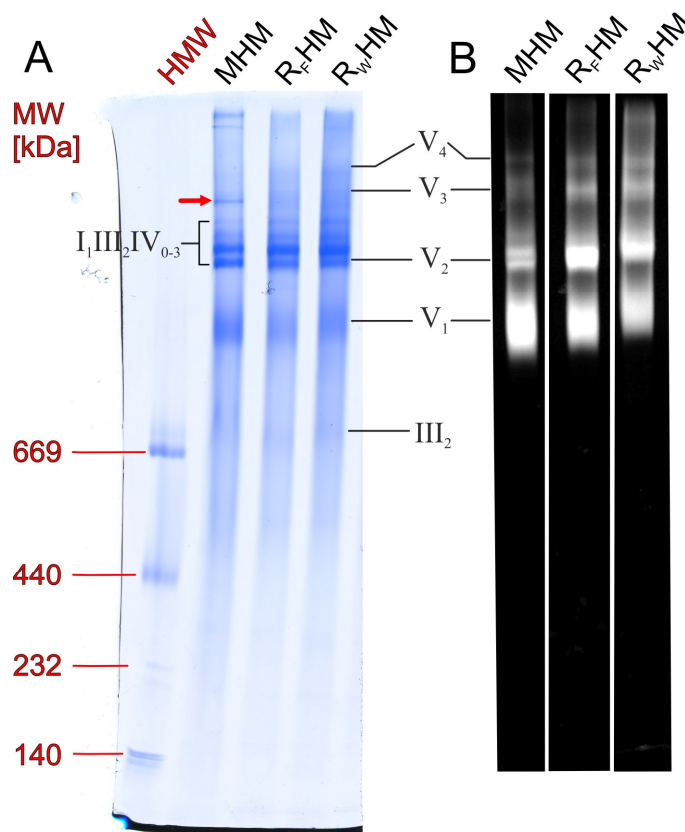


Abbildung 5.63: Coomassie-gefärbtes CN-Gel (A) und Hydrolyse-Aktivitätstest für Komplex V in einem CN-Gel (B) von MHM, R_FHM und R_WHM. Es wurden pro Spur jeweils 140 µg Protein (vor Solub.) von MHM Digitonin/Protein-Verhältnis von 4 g/g), R_FHM und R_WHM (je 3 g/g) auf ein großes CN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 9 %, C = 3 %) aufgetragen. Als Proteinmassenstandard wurden 4 µL des HMW-Markers (rot) auf das Gel aufgetragen (links). Es handelt sich bei dem dargestellten Aktivitätstest um ein zusammengesetztes Gel, das vollständige Gel ist im Anhang (**Abbildung 8.13 B**) dargestellt. Der farbige Pfeile (rot) deutet auf eine Banden hin, die nur bedingt zugeordnet werden kann. Da die Superkomplex a bis d nicht eindeutig zugeordnet werden können, wird nur der Bereich mit I₁III₂IV₀₋₃ markiert.

Für die Zuordnung der Proteinbanden sei auf Wittig *et al.*^[87, 137, 218], Krause *et al.*^[64] und Nakamura *et al.*^[212] verwiesen. Wie bereits in Abschnitt 5.1.6.3 zeigen die OxPhos-Komplexe aus Mäuse- und Rattenherzmitochondrien in der farblos-nativen Elektrophorese ein anderes Laufverhalten (im Vergleich zur BN-PAGE). Im oberen Bereich des Coomassie-gefärbten

Gels sind sowohl bei MHM als auch bei R_FHM und R_WHM zwei Banden mit hoher Intensität zu sehen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die Superkomplexe a und b und das Dimer von der ATP-Synthase V₂. Aufgrund der Überlagerung dieser Proteine ist eine eindeutigere Zuordnung nicht möglich. Knapp darüber sind vermutlich die Superkomplexe c und d zu finden. Im Vergleich zu dem CN-Gel von BHM, DHM, PHM und WHM (Abbildung 5.59 A) besitzen diese Banden eine bessere Auflösung und eine etwas höhere Intensität. Bei MHM ist darüber hinaus eine weitere Bande (**roter Pfeil**) eindeutig zu erkennen. Es könnte sich um die Bande handeln, die bereits in den BN-Gelen (Abschnitt 5.1.2.2) dieser Proben zu finden war. Diese Bande zeigte zwar eine Aktivität für Komplex I, aber nicht für Komplex IV. Für eine genauere Charakterisierung sind weitere Experimente notwendig.

Während die Banden für das Trimer V₃ und das Tetramer V₄ bei R_FHM und R_WHM ansatzweise zu sehen sind, ist bei MHM in diesem Bereich keine Bande zu erkennen. Des Weiteren ist eine Bande für das Monomer der ATP-Synthase zu finden, sie ist leicht verschmiert und besitzt eine hohe Intensität. Die Bande für den individuellen Komplex III₂ ist ebenfalls leicht verschmiert, zeigt aber nur eine geringe Intensität. Weitere Banden für den Komplex I und IV sind nicht zu erkennen. Dies deutet wie auch bei den Proben im vorherigen Abschnitt darauf hin, dass die Komplexe I, III und IV hauptsächlich in Superkomplexen gebunden sind.

Der Hydrolyse-Aktivitätstest von MHM, R_FHM und R_WHM ist in Abbildung 5.63 B dargestellt. Das Monomer, das Dimer, das Trimer und das Tetramer der ATP-Synthase können zugeordnet werden. Erneut ist bei allen Proben zu beobachten, dass im Bereich des Monomers die größte Menge an gebildetem Präzipitat zu finden ist, das Dimer besitzt eine deutlich niedrigere Intensität. Bei MHM sind in diesem Bereich zwei Banden zu erkennen, für die folgenden Betrachtungen werden diese Banden zusammen ausgewertet. Ebenso ist bei MHM zu sehen, dass die Banden für V₃ und V₄ eine geringere Menge an Präzipitat im Vergleich zu Proben aus Rattenherz aufweisen. Wie erwartet zeigen die ATP-Synthasen aus Wistar- und Fischerratten ein sehr ähnliches Bandenmuster, auch die Intensität der Färbung scheint bei allen Assemblierungen nahezu identisch zu sein.

Für die quantitative Auswertung dieses Hydrolyse-Tests wurde, wie in Abschnitt 5.1.6.2 beschrieben, vorgegangen. Für die 2-D CN/SDS-Gele wurden jeweils 3 technische Replikate von Solubilisaten (140 µg, vor Solub.) aus R_FHM, R_WHM (3 g/g) und MHM (4 g/g) verwendet. Die entsprechenden 2-D Gele sind im Anhang (Abbildung 8.16 und Abbildung 8.17) gezeigt.

Die relativen spezifischen Hydrolyse-Aktivitäten von MHM, R_FHM und R_WHM sind in Abbildung 5.64 A dargestellt. Für das Monomer der ATP-Synthase besitzt MHM die höchste spezifische Aktivität, im Vergleich zu R_FHM ist MHM um den Faktor 1,22 aktiver (stat. sig.). V₁ von Wistar- und Fischerratten zeigen nahezu identische Werte im Bereich 0,14 relative Graustufenwerte pro Minute. Für das Dimer zeigen MHM und R_FHM sehr ähnliche

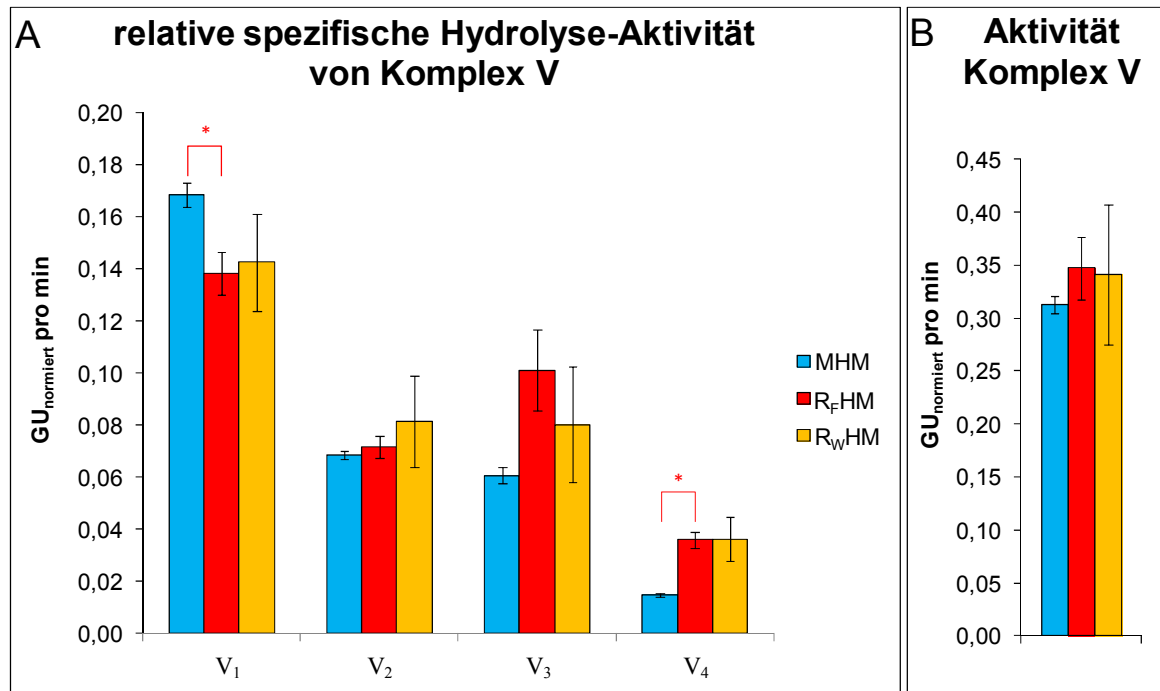


Abbildung 5.64: relative spezifische Hydrolyse-Aktivitäten des Monomers V₁, Dimers V₂, Trimers V₃ und Tetramers V₄ der ATP-Synthase (A) und die Gesamtaktivität von Komplex V (B) von MHM, R_FHM und R_WHM. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang (Abbildung 8.13 B). Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der spezifischen Aktivitäten in Graustufenwerten pro Minute (GU_{normiert} pro min). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Rote Sterne zeigen den Vergleich mit R_FHM (R_FHM vs MHM, R_FHM vs R_WHM).

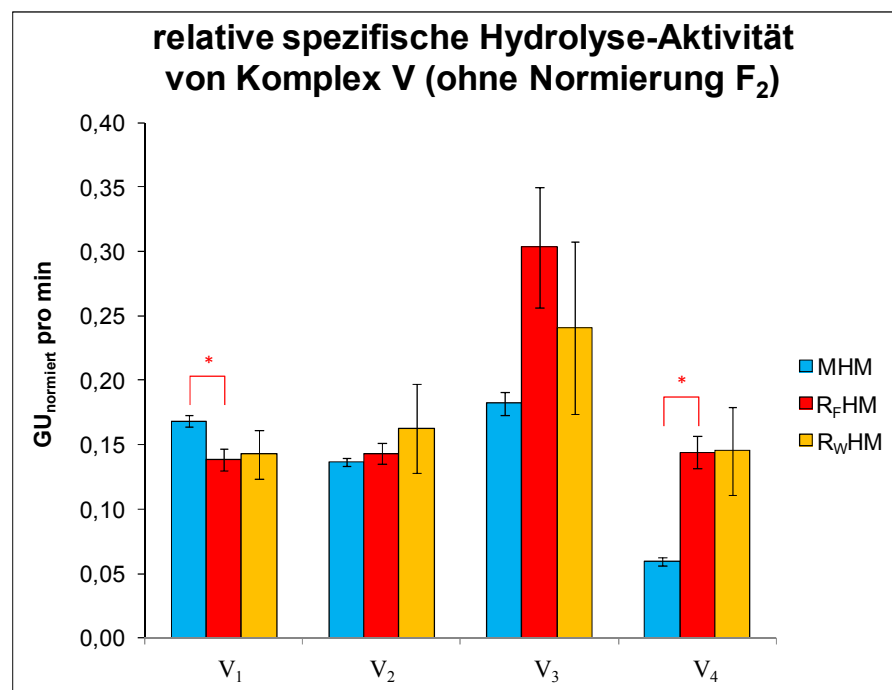


Abbildung 5.65: relative spezifische Hydrolyse-Aktivitäten des Monomers V₁, Dimers V₂, Trimers V₃ und Tetramers V₄ der ATP-Synthase (ohne den Normierungsfaktor F₂). Weitere Angaben sind identisch mit Abbildung 5.64.

spezifische Aktivitäten, R_{WHM} besitzt einen etwas höheren Wert (Faktor 1,14, stat. n. sig.). Für das Trimer besitzt R_{FHM} eine höhere Hydrolyse-Aktivität als MHM und R_{WHM} . Bedingt durch die großen Fehlerbalken sind diese Unterschiede allerdings statistisch nicht signifikant. Bei den spezifischen Aktivitäten für das Tetramer ist zu sehen, dass die Proben aus Rattenherzmitochondrien ähnlich aktiv sind, im Vergleich zu MHM sind sie um den Faktor 2,43 aktiver (für R_{FHM} stat. sig.).

Bei einem Vergleich der Aktivitäten der Assemblierungen der ATP-Synthase ist ein ähnlicher Trend wie in Abschnitt 5.1.6.3 zu beobachten: Das Monomer zeigt die höchste spezifische Hydrolyse-Aktivität. Da bei den Oligomeren V_2 und V_3 unterschiedliche Trends zu sehen sind, müssen diese bei den untersuchten Proben getrennt voneinander betrachtet werden. Für MHM ist zu erkennen, dass mit steigendem Assemblierungsgrad die Aktivität abnimmt. Im Gegensatz dazu sind bei R_{FHM} und bei R_{WHM} die Aktivitäten von V_2 und V_3 sehr ähnlich. Das Tetramer von Komplex V besitzt wiederum bei MHM, R_{FHM} und R_{WHM} die mit Abstand niedrigste Hydrolyse-Aktivität.

Krause *et al.*^[64] haben die Komplex-V-Aktivität in verschiedenen Geweben (Hirn, Leber, Niere, Muskel) von männlichen Fischerratten untersucht. Auch hierbei zeigte sich, dass die monomeren und oligomeren Formen eine ähnliche Hydrolyse-Aktivität besitzen. Da auch hier keine genauen Angaben zur Berechnung zu finden sind, muss davon ausgegangen werden, dass keine Normierung auf die Anzahl der im Oligomer enthaltenen ATP-Synthasen vorgenommen wurde. Die berechneten spezifischen Aktivitäten ohne diesen Normierungsfaktor (F_2 , Normierung Abschnitt 4.11.3) sind in Abbildung 5.65 dargestellt. Bei der ATP-Synthase aus Mäuseherzmitochondrien fällt auf, dass Monomer, Dimer und Trimer ähnliche spezifische Aktivitäten besitzen. Bei den Proben R_{FHM} und R_{WHM} trifft dies für das Monomer, das Dimer und das Tetramer zu, das Trimer weist eine fast doppelt so hohe Hydrolyse-Aktivität auf (Faktor 1,81, Mittelwert).

In Abbildung 5.64 B sind die Gesamtaktivitäten der ATP-Synthase (ausgehend von den Aktivitäten inkl. Normierungsfaktor F_2) gezeigt. Während R_{FHM} und R_{WHM} sehr ähnliche Werte besitzen, ist bei MHM ein um 11 % niedrigere Aktivität zu erkennen. Bedingt durch die großen Fehlerbalken ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

Im Rahmen dieses Aktivitätstests wurden die Untereinheiten α und β von Komplex V in 2-D CN/SDS-Gelen von MHM, R_{FHM} und R_{WHM} quantifiziert. Aus diesen Datensätzen wurde die prozentuale Verteilung der ATP-Synthase auf V_1 , V_2 , V_3 und V_4 berechnet (Abbildung 5.66). Im Vergleich zu Komplex V aus Rattenherzmitochondrien liegen bei MHM mehr als 60 % in monomer Form vor, dies entspricht einem statistisch signifikanten Unterschied um den Faktor 1,5 (Vgl. R_{FHM}). R_{FHM} und R_{WHM} besitzen nahezu identische Werte, auf das Monomer entfallen 40 %. Für Dimer zeigt R_{FHM} den größten Wert (Vgl. MHM und R_{WHM} stat. sig.). Des Weiteren ist zu erkennen, dass der Anteil an V_2 tendenziell größer ist als V_1 , bei R_{WHM} sind die Werte für V_1 und V_2 nahezu identisch. Bei MHM ist wie erwartet der Anteil für das Dimer deutlich niedriger. In diesem Zusammenhang sei auf die prozentuale Verteilung von Komplex V in 2-D BN/SDS-Gelen (Abbildung 5.45, Seite 127) verwiesen,

dort zeigte sich bereits, dass bei MHM der Anteil an Monomer sehr groß ist (mehr als 77 %). Bei R_FHM besaßen Monomer und Dimer nahezu identische Werte.

Sowohl für das Trimer als auch für das Tetramer besitzen die Herzmitochondrien aus Wistarratten einen höheren Anteil als MHM und R_FHM (stat. sig.), dagegen zeigen diese beiden Proben für V₃ und V₄ nahezu identische Werte.

Krause^[88] konnte für Komplex V aus Rattenherzmitochondrien zeigen, dass der Anteil der Oligomere bei 70 bis 80 % (bei CN-PAGE) liegt. Bei Mitochondrien aus Rattenhirngewebe konnte unter ähnlichen Bedingungen sogar nachgewiesen werden, dass nur 10 % in monomerer Form vorliegen.

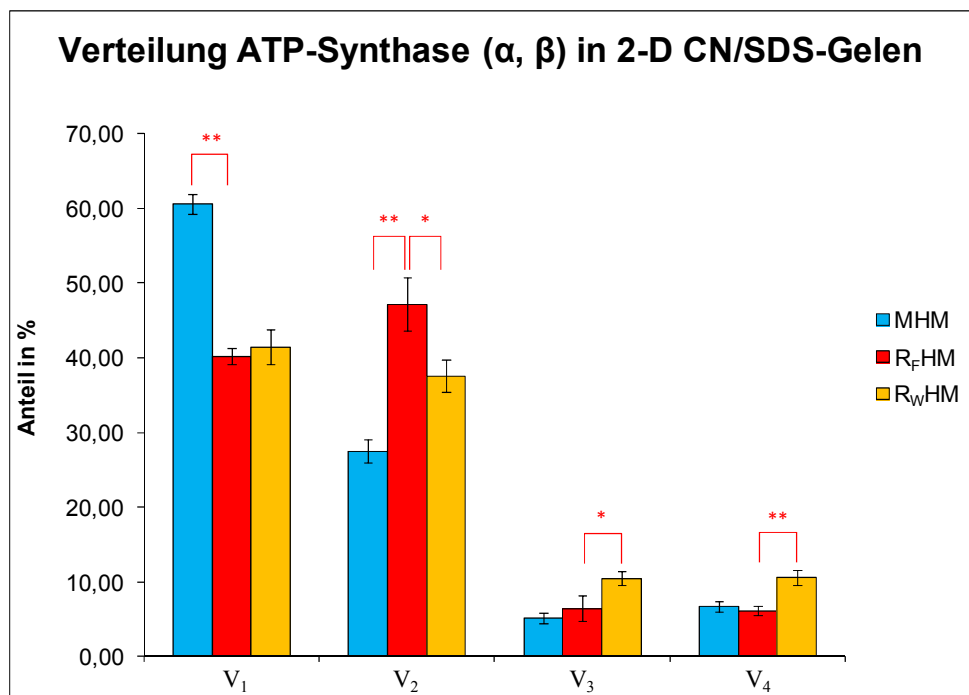


Abbildung 5.66: prozentuale Verteilung der ATP-Synthase (Untereinheiten α und β) als Monomer V₁, Dimer V₂, Trimer V₃ und Tetramer V₄ in 2-D CN/SDS-Gelen von MHM, R_FHM und R_WHM. Die für die Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.16 und 8.17) gezeigt. Die Signifikanzniveaus sind **Abbildung 5.64** zu entnehmen. **Rote Sterne** zeigen den Vergleich mit R_FHM (R_FHM vs MHM, R_FHM vs R_WHM).

5.1.6.5 Herzmitochondrien aus Rehherz und Rehnier

DHM und DKM wurden mittels CN-PAGE (T = 4 - 9 %, C = 3 %) aufgetrennt. Es wurden pro Spur jeweils 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) Protein von den Proben aufgetragen. Das Coomassie-gefärbte CN-Gel ist in Abbildung 5.67 A gezeigt, der entsprechende Hydrolyse-Aktivitätstest ist in Abbildung B dargestellt. Bei dem Aktivitätstest handelt es sich um ein zusammengesetztes Gel, das vollständige Gel ist im Anhang (Abbildung 8.13 C) zu finden. Es wurden pro Probe jeweils drei technische Replikate (gleiche Solubilisierung) eingesetzt.

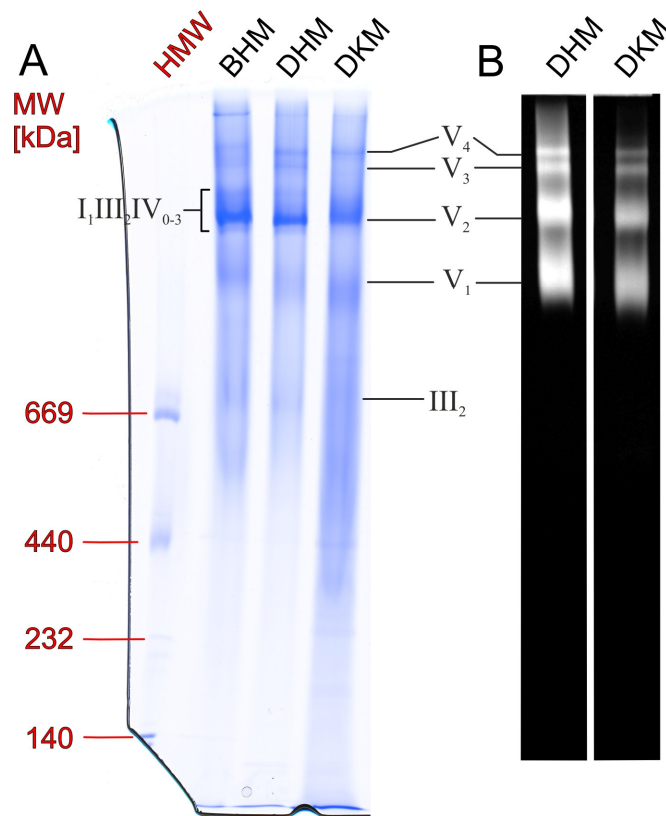


Abbildung 5.67: Coomassie-gefärbtes CN-Gel (A) und Hydrolyse-Aktivitätstest für Komplex V in einem CN-Gel (B) von DHM und DKM. Es wurden pro Spur jeweils 140 µg (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) Protein von DHM und DKM auf ein großes CN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 9 %, C = 3 %) aufgetragen. Als Proteinmassenstandard wurden 4 µL des HMW-Markers (rot) und BHM (100 µg vor Solub., 3 g/g) auf das Gel aufgetragen (links). Es handelt sich bei dem dargestellten Aktivitätstest um ein zusammengesetztes Gel, das vollständige Gel ist im Anhang (**Abbildung 8.13 C**) dargestellt. Da die Superkomplex a bis d nicht eindeutig zugeordnet werden können, wird nur der Bereich mit I₁III₂IV₀₋₃ markiert.

Die Zuordnung der Proteinbanden erfolgt analog zu Abbildung 5.59 nach Wittig *et al.*^[87, 137, 218] und Meyer *et al.*^[219]. Im oberen Bereich des Coomassie-gefärbten CN-Gels (Abbildung 5.67 A) ist eine Bande mit hoher Intensität zu erkennen. Wie bereits in Abschnitt 5.1.6.3 erörtert, handelt es sich wahrscheinlich um das Dimer des ATP-Synthase und den Superkomplex b. Die Superkomplexe c und d liegen vermutlich oberhalb dieser Bande. Da in diesem Bereich die Banden sehr verschmiert und nicht voneinander zu trennen sind, ist eine

eindeutige Zuordnung von $I_1III_2IV_2$ (c) und $I_1III_2IV_3$ (d) bei beiden Proben nicht möglich. Während bei DHM unterhalb noch eine weitere Bande mit deutlich geringerer Intensität zu sehen ist, wahrscheinlich Superkomplex a, tritt diese Bande bei DKM nicht auf. Des Weiteren können bei DHM das Trimer V_3 und das Tetramer V_4 von Komplex V zugeordnet werden. Bei DKM ist in diesem Bereich (der Oligomere) nur die Bande für das Tetramer zu sehen, die Bande für das Trimer tritt nicht auf. Sowohl bei den mitochondrialen Proteinen aus Rehherz als auch aus Rehnier ist eine Bande für das Monomer der ATP-Synthase zu finden, im Vergleich zu DHM besitzt diese Proteinbande bei DKM eine höhere Intensität. Ebenso ist bei beiden Proben der individuelle Komplex III_2 zu erkennen. Wie bereits in den Abschnitten 5.1.6.3 und 5.1.6.4 weist auch dieses Coomassie-gefärbtes CN-Gel keine Banden für den individuellen Komplex IV_1 , das Dimer IV_2 bzw. den Superkomplex III_2IV_1 auf.

Der In-Gel Aktivitätstest für Komplex V ist in Abbildung 5.67 B gezeigt. Das Monomer V_1 und die Oligomere (V_{2-4}) der ATP-Synthase zeigen sowohl bei DHM als auch bei DKM eine Hydrolyse-Aktivität. Wie auch in den vorherigen Abschnitten ist wieder bei dem Monomer die meiste Menge an Präzipitat, weißes Bleiphosphat, gebildet worden. Im Vergleich dazu besitzen bei DHM und DKM die dimeren Formen eine schwächere Färbung. Trimer und Tetramer zeigen bei DHM eine ähnlich schwache Färbung. Obwohl bei DKM in dem Coomassie-gefärbten Gel die Bande für das Trimer nicht zugeordnet werden konnte, besitzen die Banden für das Trimer und das Tetramer bei dem Aktivitätstest eine ähnliche Intensität. Vergleicht man die Menge an gebildetem Präzipitat in beiden Proben, dann ist zu erkennen, dass bei DKM deutlich weniger Bleiphosphat vorhanden ist als bei DHM.

Für die quantitative Auswertung dieses Hydrolyse-Tests wurde, wie im Abschnitt 5.1.6.2 beschrieben, vorgegangen. Für die 2-D CN/SDS-Gele wurden jeweils 3 technische Replikate von Solubilisaten aus DHM und DKM (140 µg, vor Solub., 3 g/g) verwendet. Die entsprechenden 2-D Gele sind im Anhang (Abbildung 8.15 und 8.17) zu finden.

Die relativen spezifischen Hydrolyse-Aktivitäten von DHM und DKM sind in Abbildung 5.68 A dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sowohl für das Monomer als auch für die Oligomere (V_{2-4}) der ATP-Synthase DHM eine deutlich höhere spezifische Aktivität (2,5 fach, stat. sig.) als DKM besitzt. In allen Fällen sind die Unterschiede statistisch signifikant. Ebenso ist zu sehen, dass mit steigendem Assemblierungsgrad die Hydrolyse-Aktivität abnimmt (ähnlich wie bei BHM, PHM und WHM, Abschnitt 5.1.6.3).

Die Hydrolyse-Aktivitäten ohne den Normierungsfaktor F_2 (Abbildung 5.69) zeigen, dass die Aktivitäten von Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer unter diesen Betrachtungen in einem ähnlichen Bereich liegen (sowohl für DHM als auch für DKM). Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Krause^[64, 88] für Komplex V aus Herz-, Nieren- und Lebergewebe von männlichen Wistarratten überein.

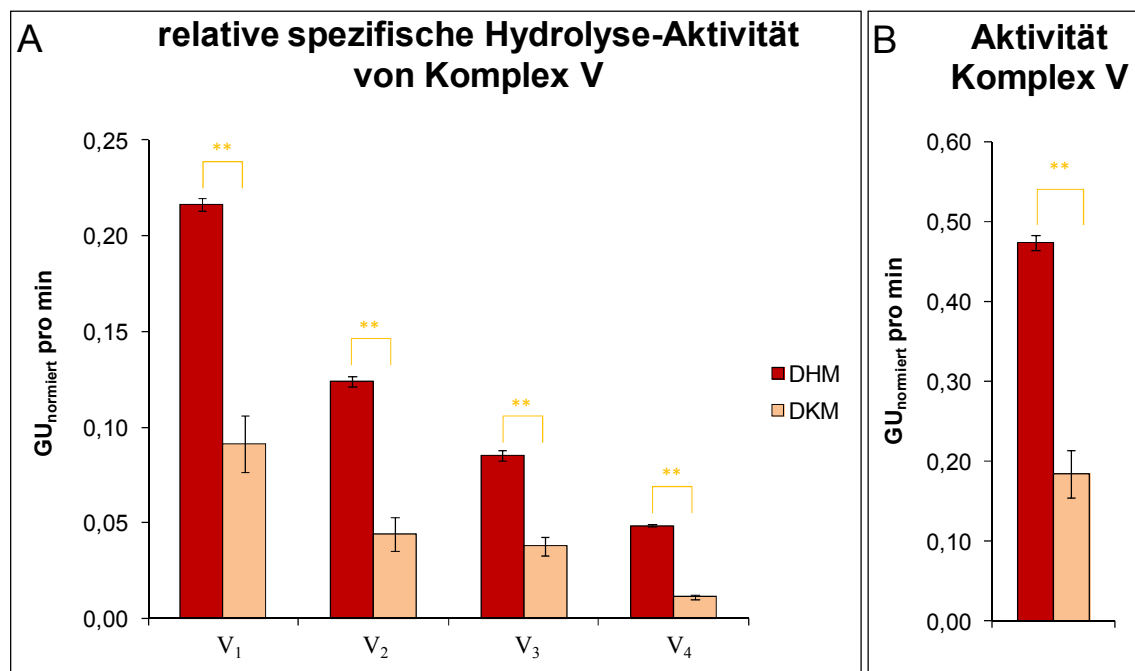


Abbildung 5.68: relative spezifische Hydrolyse-Aktivitäten des Monomers V₁, Dimers V₂, Trimers V₃ und Tetramers V₄ der ATP-Synthase (A) und die Gesamtaktivität von Komplex V (B) von DHM und DKM. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang (Abbildung 8.13 C). Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der spezifischen Aktivitäten in Graustufenwerten pro Minute (GU_{normiert} pro min). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Orangene Sterne zeigen den Vergleich zwischen DHM und DKM.

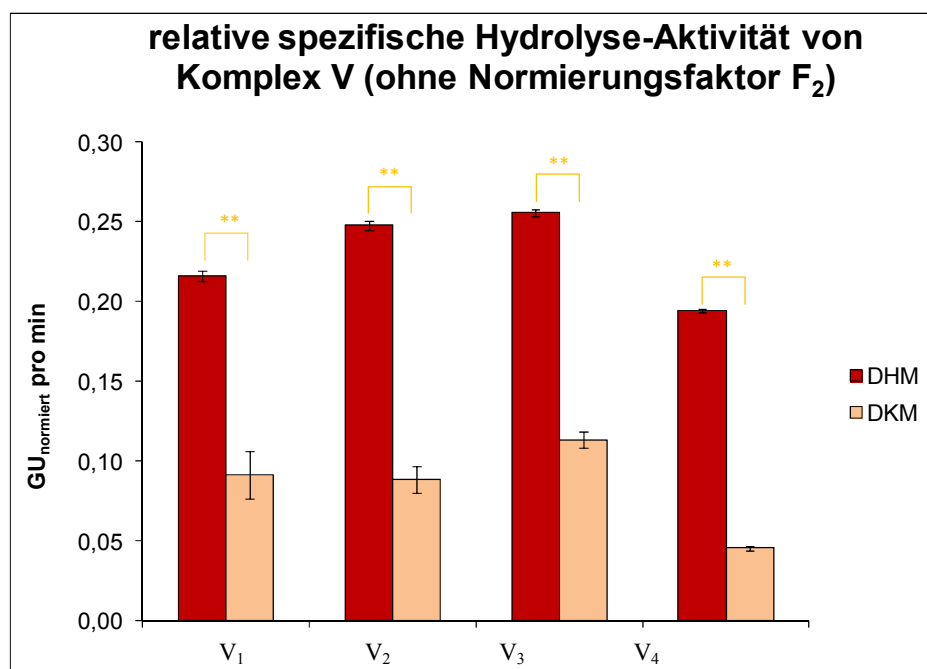


Abbildung 5.69: relative spezifische Hydrolyse-Aktivitäten des Monomers V₁, Dimers V₂, Trimers V₃ und Tetramers V₄ der ATP-Synthase (ohne den Normierungsfaktor F₂). Weitere Angaben sind identisch mit Abbildung 5.68.

Die Gesamtaktivität von Komplex V ist in Abbildung 5.68 B dargestellt. Der in Abbildung A gezeigte Unterschied zwischen der Aktivität der ATP-Synthase aus Nieren- und Herzmitochondrien ist auch dort zu sehen. Im Vergleich zu DKM ist bei DHM die Hydrolyse-Aktivität um den Faktor 2,56 höher (stat. sig.)

Phillips *et al.*^[162] untersuchten die Hydrolyse-Aktivität in Leber und Herzmitochondrien aus Schwein und Maus. Für die ATP-Synthase aus Schweinegewebe konnte gezeigt werden, dass die Aktivität aus Herzmitochondrien um den Faktor 3,3 größer ist. Dagegen waren bei den Mitochondrien aus Maus die Aktivitäten aus Leber- und Nierengewebe nahezu identisch^[162]. Für diese Experimente wurden die mitochondrialen Proteine mit dem Detergens DDM, welches die Superkomplexe und die Oligomere der ATP-Synthase disassembliert, solubilisiert.

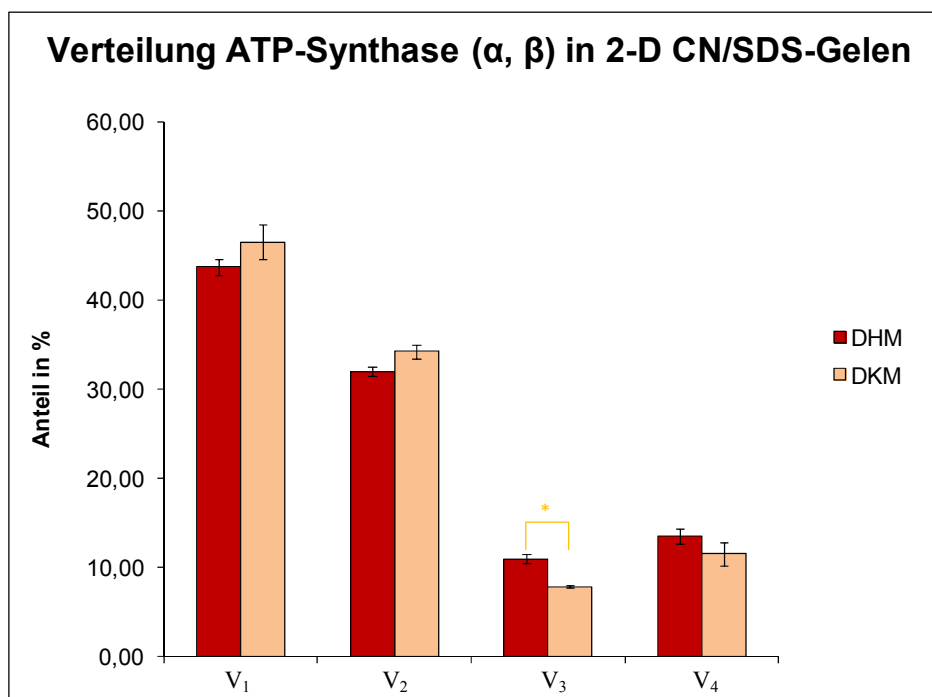


Abbildung 5.70: prozentuale Verteilung der ATP-Synthase (Untereinheiten α und β) als Monomer V₁, Dimer V₂, Trimer V₃ und Tetramer V₄ in 2-D CN/SDS-Gelen von DHM und DKM. Die für die Auswertung verwendeten Gele sind im Anhang (Abbildung 8.15 und 8.17) gezeigt. Die Signifikanzniveaus sind **Abbildung 5.68** zu entnehmen. **Orange Sterne** zeigen den Vergleich zwischen DHM und DKM.

Eine prozentuale Verteilung der ATP-Synthase von Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer ist in Abbildung 5.70 gezeigt. Für diese Darstellung wurden die Graustufenwerte der Untereinheiten α und β aus den 2-D CN/SDS-Gelen von DHM und DKM verwendet, hierbei handelt es sich um die auf die jeweilige Proteinmenge der Proben normierten Werte. Für das Monomer zeigen DHM und DKM nahezu identische Werte (44 % bzw. 46 %). Ähnliche Anteile wurden bereits in Abschnitt 5.1.6.3 für Komplex V aus PHM und WHM gefunden. Auch für das Dimer sind die Werte sehr ähnlich (DHM: 31 %, DKM: 34 %). Bei dem Trimer zeigt DHM einen signifikant höheren Anteil als DKM (Faktor 1,39). Für das Tetramer sind die Werte bei beiden Proben erneut sehr ähnlich.

5.1.6.6 Zusammenfassung

Erste Experimente des Hydrolyse-Aktivitätstests der ATP-Synthase beschäftigten sich mit der Optimierung dieses Tests in unterschiedlichen Gelsystemen, der BN- und der CN-PAGE. Da Solubilisate aus Rinderherzmitochondrien (mit dem milden Detergens Digitonin) nicht nur in unserer Arbeitsgruppe, sondern auch von Schägger *et al.*^[63, 150] und Wittig *et al.*^[70, 115] sehr gut charakterisiert sind, wurden sie für diese ersten Versuche verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass bei der BN-PAGE der verwendete Farbstoff Coomassie den Nachweis der Hydrolyse-Aktivität von Komplex V beeinträchtigt, sowohl bei der Zugänglichkeit des Substrats als auch bei der Detektion des gebildeten Präzipitats. Unter diesen Bedingungen war der Test im Vergleich zu den anderen Aktivitätstests für Komplex I und IV sehr zeitaufwendig und eignete sich nicht für eine quantitative Auswertung. Abhilfe schaffte die Verwendung der CN-PAGE, bereits nach wenigen Minuten in der Aktivitätstest-Lösung konnte das weiße Präzipitat Bleiphosphat bei der monomeren Form der ATP-Synthase nachgewiesen werden und nach 30 Minuten waren Banden für das Dimer und die Oligomere V₃ und V₄ zu erkennen. Diese Verfahren hatte allerdings den Nachteil, dass die Banden diffuser sind. Darüber hinaus zeigten die Oligomere der ATP-Synthase und der anderen OxPhos-Komplexe ein anderes elektrophoretisches Laufverhalten, es kam zu einer Überlagerung der Banden für das Dimer von Komplex V und der Superkomplexe a und b. Ähnliche Beobachtungen sind in den Arbeiten von Krause *et al.*^[64, 88] zu finden. Für eine quantitative Auswertung eines Aktivitätstests (siehe Abschnitt 4.11.2 und 4.11.3) müssen auch die Proteinmengen der an der enzymatischen Reaktion beteiligten Proteinbanden bekannt sein. Aufgrund der oben beschriebenen Problematik gestaltete sich dies sehr schwierig, daher wurden als Näherung die Untereinheiten α und β des Monomers, des Dimers, des Trimers und des Tetramers von Komplex V in 2-D CN/SDS-Gelen quantifiziert.

Anhand des Aktivitätstests mit den mitochondrialen Solubilisaten aus Reh-, Schwein- und Wildschweinherz und Rehnire wurde nachgewiesen, dass auch diese bis dato noch nicht untersuchten Säugetiere Oligomere der ATP-Synthase ausbilden, die eine Hydrolyse-Aktivität zeigen. Ähnliche Resultate wurden bei den Solubilisaten aus Mäuse- und Rattenherz gefunden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Krause *et al.*^[64], Meyer *et al.*^[219] und Paumard *et al.*^[60] konnte gezeigt werden, dass die monomere Form die höchste Hydrolyse-Aktivität besitzt und mit steigendem Assemblierungsgrad die Aktivität abnimmt. Da aus diesen Veröffentlichungen die Berechnung der Werte nicht nachverfolgt werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass bei der Normierung der Aktivitäten nicht die Anzahl der in den Oligomeren enthaltenen ATP-Synthasen berücksichtigt wurde. Ohne diesen Normierungsfaktor besaßen auch das Dimer und das Trimer näherungsweise ähnliche Hydrolyse-Aktivitäten mit Ausnahme der Proben von Wistar und Fischer-Ratten, dort hatte das Trimer eine höhere Aktivität als Monomer und Dimer.

Aus den Daten der 2-D Gelen konnten auch weitere Informationen über die Verhältnisse der monomeren Form und der oligomeren Formen der ATP-Synthase (in CN-Gelen) erhalten werden. Im Abschnitt 5.1.5, Quantitative Analyse des mitochondrialen Proteoms in 2-D BN/SDS-Gelen, wurde für BHM, DHM, PHM, WHM und MHM dargestellt, dass die ATP-

Synthese zu 60 bis 75 % (abhängig vom Gewebe) als Monomer vorliegt. Bei der CN/SDS PAGE lagen mehr als 50 % von Komplex V noch in oligomere Form vor. Es handelt sich somit bei der CN-PAGE um eine sehr milde native Elektrophorese, bei der die Protein-Protein-Wechselwirkung deutlich besser erhalten bleiben als bei der BN-PAGE.

Welche Bedeutung kommt den Dimeren und höheren Oligomeren der ATP-Synthase zu. Davies *et al.*^[73] haben herausgefunden, dass die Dimere aufgrund ihrer räumlichen Form für die Krümmungen der Cristae verantwortlich sind. Ihre kryoelektronentomographischen Untersuchungen haben sogar gezeigt, dass die dimeren Formen von Komplex V in Pilzen und anderen Säugetieren (Rind, Ratte) große strukturelle Ähnlichkeiten besitzen. Dagegen gibt es bei Algen, Pflanzen und Protisten teilweise erhebliche Unterschiede in dem Winkel zwischen zwei ATP-Synthasen oder der Position des peripheren Stiels relativ zum Kopfteil F_1 ^[7, 73]. Neben dieser strukturgebenden Funktion taucht in vielen Veröffentlichungen auch öfters die Frage auf, ob durch die Assemblierung zu Dimeren, Trimeren und weiteren Oligomeren auch die katalytische Aktivität der ATP-Synthase beeinflusst wird^[7, 73, 80, 223].

In meiner Arbeit konnte ich nachweisen, dass eine Oligomerisierung von Komplex V zu einer deutlichen Reduktion der Hydrolyse-Aktivität führt. Wenn beispielsweise bei einer Zelle der Aufbau des Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran gestört ist, würde die Hydrolyse des gebildeten ATPs deutlich langsamer ablaufen. Besonders für Zellen in Geweben mit einem hohem metabolischen Umsatz, z.B. Gehirn und Muskeln, wäre dies von Vorteil. Allerdings wurden bereits ein Protein entdeckt, welches an der Regulation der Hydrolyse-Aktivität der ATP-Synthase beteiligt ist, das Inhibitorprotein IF_1 ^[224]. Es konnte bisher nur bei Säugetieren nachgewiesen werden und liegt nur bei einem pH-Wert < 6,5 in aktiver Form vor^[225], dann bindet es als Homodimer an die katalytisch aktive Untereinheit β von zwei ATP-Synthasen^[226].

In welchem Zusammenhang die von Komplex V katalysierte Hydrolyse bzw. Synthese von ATP stehen, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt, da es zwischen diesen beiden Funktionen viele verschiedene Mechanismen für eine Inhibierung und Reaktivierung gibt^[36]. Unter der Annahme, dass eine Verringerung der Hydrolyse-Aktivität mit einer Zunahme der ATP-Synthese korreliert, würde die Syntheserate mit steigendem Assemblierungsgrad deutlich zunehmen. Diese würde für die Zelle nicht nur einen metabolischen Vorteil bei der Aufrechterhaltung des ATP-Spiegels bedeuten, sondern würde auch eine Möglichkeit darstellen über die Assemblierung von ATP-Synthasen gezielt die katalytische Aktivität zu steuern.

Um die tatsächliche ATP-Syntheserate zu messen, wird das Luciferin-Luciferase-System verwendet^[53, 227]. Für das isolierte Monomer der Chloroplasten-ATP-Synthase (aus *Spinacia oleracea*) konnte bereits die Syntheserate bestimmt werden^[53]. Das größte Problem bei diesem Verfahren ist die Isolierung von intakten Oligomeren. Im Rahmen der Masterarbeit von Victoria Petermann^[90] wurde versucht mittels kontinuierlicher Elutions-Elektrophorese (BioRad Prep Cell 491) das Dimer von Komplex V aus Rinderherzmitochondrien zu isolieren. Allerdings war bei allen Tests ein Zerfall in das Monomer zu beobachten. Ähnliche

Ergebnisse wurden mit der Elektro- und Diffusionselution erzielt. Auch die Isolierung des intakten mitochondrialen Dimers der ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii*, das eine hohe Stabilität besitzt^[57], blieb erfolglos.

5.2 Charakterisierung von Protein-Komplexen in *Chlamydomonas reinhardtii*

Untersuchungen von Meyer zu Tittingdorf *et al.*^[8, 9] und Hema *et al.*^[10] haben gezeigt, dass unterschiedliche Stress-Faktoren die Morphologie und das Wachstum der Grünalge *C. reinhardtii* beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher analysiert werden, inwieweit der Parameter Temperatur (während der Wachstumsphase) sich auf die Organisation und die Aktivität der Atmungskettenkomplexe auswirkt. Dazu wurden mit Mitochondrien angereicherte Fraktionen der unterschiedlichen Präparationen mit dem milden Detergens Digitonin solubilisiert und anschließend eine blau-native Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Aktivitätstests der Komplexe I und IV sei auf Abschnitt 4.8.1 und 4.8.2 verwiesen. Zunächst werden diese BN-Gele qualitativ diskutiert und danach eine quantitative Auswertung (gemäß Abschnitt 4.11.2) der enzymatisch aktiven Proteinkomplexe vorgenommen. Des Weiteren wurde eine 2-D BN/SDS-PAGE von einer mitochondrialen Probe durchgeführt, nach einer Silberfärbung wurden Proteinspots ausgeschnitten und mittels "Peptid Mass Fingerprint" (PMF) identifiziert. Der Gellauf und das Ausschneiden der Spots erfolgte in Darmstadt, der tryptische Verdau und die Identifizierung der Peptide wurden in Kooperation mit dem DDZ in Düsseldorf durchgeführt.

5.2.1 Isolierung der Mitochondrien

Die Grünalge *C. reinhardtii* besitzt eine hohe metabolische Vielseitigkeit und kann unterschiedliche Kohlenstoffquellen für das Wachstum nutzen. Bei photomixotrophem Wachstum wird dem Anzuchtmedium Acetat zugesetzt, unter Verwendung von Licht können dadurch komplexe organische Moleküle synthetisiert werden, die für den Stoffwechsel benötigt werden. Bei photoautotrophem Wachstum wird nur das in der Luft vorkommende CO₂ als Kohlenstoffquelle genutzt. In Tabelle 5.15 ist eine Übersicht der isolierten Mitochondrien dargestellt. Da für die Trennung von Chloroplasten und Mitochondrien die Differentialzentrifugation verwendet wurde, sind bei allen Proben auch chloroplastidäre Proteine als Verunreinigung zu finden. In der Regel wird das Verhältnis dieser Organellen unter gleichen Präparationsbedingungen als konstant angesehen^[133]. Daher wurde als Näherung für die Konzentration der mitochondrialen Proteine die Chlorophyll-Konzentration (Abschnitt 4.2.1.1) ermittelt.

Tabelle 5.15: Übersicht der mitochondrialen Präparationen von *C. reinhardtii*. Als Näherung wurde für die Konzentration der Proteine die Chlorophyll-Konzentration (siehe Abschnitt 4.2.1.1) verwendet.

Anzuchtart	Bezeichnung	Anzuchttemperatur [°C]	Chlorophyll-Konzentration der Mitochondrien [mg/mL]
photomixotroph	M1P ₂₂	22	0,708
	M2P ₂₈	28	0,642
	M5P ₃₁	31	0,471
	M6P ₃₄	34	0,216
photoautotroph	M4P ₂₂	22	0,696
	M7P ₂₈	28	0,652

5.2.2 Zuordnung der Proteinbanden von *C. reinhardtii* in BN-Gelen

5.2.2.1 Photomixotrophes Wachstum

Die mitochondrialen Proteine der Alge *C. reinhardtii* bei verschiedenen Anzuchttemperaturen (22, 28, 31 und 34 °C) werden mittels BN-PAGE analysiert. Das Wachstum der Algen erfolgte photomixotroph (TAP-Medium, Abschnitt 4.2), die Probenbezeichnungen sind Tabelle 5.15 zu entnehmen. Es wurden pro Spur jeweils 30 µg Protein (vor Solub., bezogen auf die Chlorophyll-Konzentration, Digitonin/Chlorophyll-Verhältnis von 40 g/g) auf ein großes BN-Gel aufgetragen. Die optimalen Digitonin/Chlorophyll-Verhältnisse wurden im Rahmen der Betreuung der Bachelorarbeit von Daniela Goedderz^[228] ermittelt.

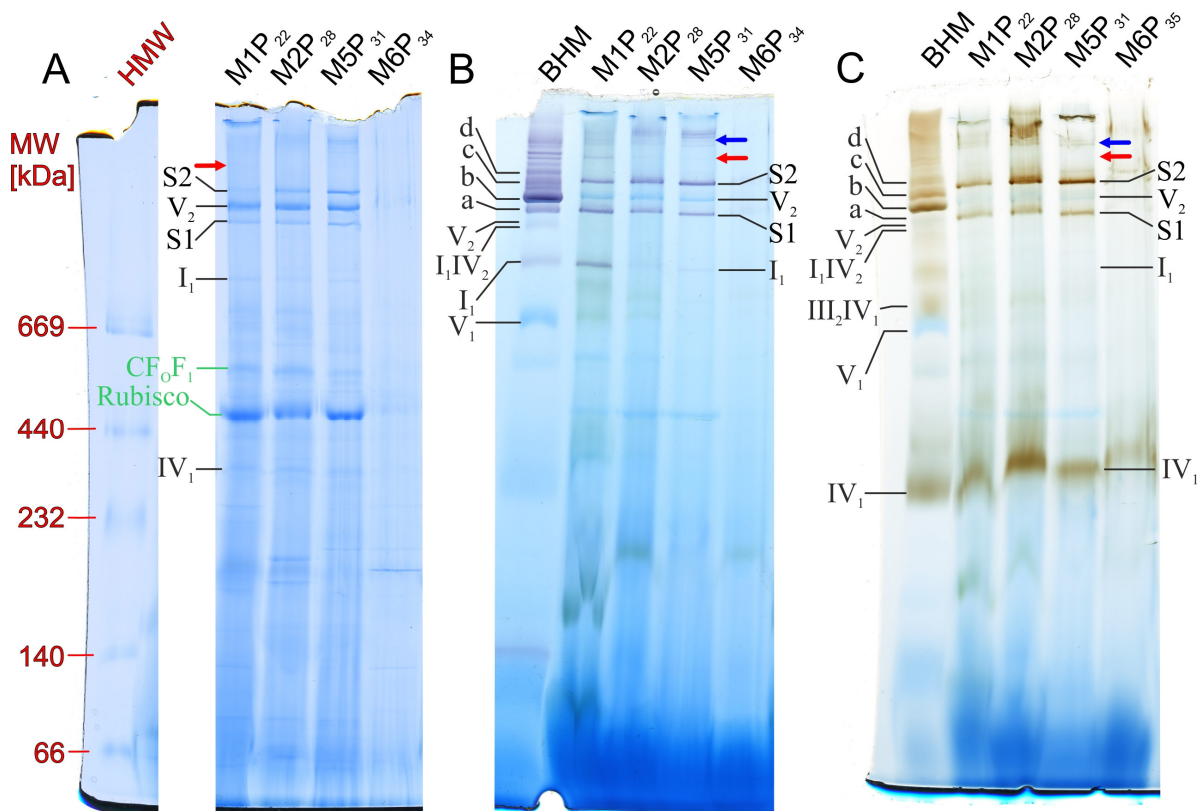


Abbildung 5.71: Zuordnung der Proteinbanden von solubilisierten Mitochondrien aus *C. reinhardtii* bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen (22, 28, 31, 34 °C, photomixotroph) auf einem Coomassie-gefärbten BN-Gel (A), in einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (B) und für Komplex IV (C). Es wurden pro Spur jeweils 30 µg Protein (vor Solub., bezogen auf die Chlorophyll-Konzentration, Digitonin/Chlorophyll-Verhältnis von 40 g/g) von den mitochondrialen Präparationen (photomixotroph) bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen (M1P₂₂, M2P₂₈, M5P₃₁, M6P₃₄) auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Für das Coomassie-gefärbte Gel wurden 4 µL des HMW-Markers (rot) auf das Gel als Proteinmassenstandard aufgetragen und für die Aktivitätstests wurde BHM (100 µg vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 3 g/g) als Standard verwendet. Die farbigen Pfeile (rot und blau) deuten auf Banden hin, die nur bedingt zugeordnet werden können. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: S1 = I₁III₂IV₁, S2 = I₁III₂IV₂ bzw. für BHM a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

Die Zuordnung der Proteinbanden von *C. reinhardtii* erfolgte nach Heidrich^[133], Schwassmann *et al.*^[84] und Reifschneider^[94]. Die apparenten Massen der Komplexe zeigen sich wie folgt: 1800 kDa für das mitochondriale Dimer der ATP-Synthase V₂, 1700 kDa für

Superkomplex S1 ($I_1III_2IV_1$), 1900 kDa für Superkomplex S2 ($I_1III_2IV_2$). Der individuelle Komplex I dieser Alge ist aus 42 Untereinheiten aufgebaut und besitzt eine molekulare Masse von 960 kDa^[229]. Die Banden von BHM (als Standard für die Aktivitätstests) wurden entsprechend Abschnitt 5.1.2.1 zugeordnet.

Ein Coomassie-gefärbtes BN-Gel ist in Abbildung 5.71 A dargestellt. Die OxPhos-Komplexe der Proben M1P₂₂, M2P₂₈ und M5P₃₁ zeigen ein sehr ähnliches Bandenmuster. Bei M6P₃₄ (Anzucht bei 34 °C) sind nur verschmierte Banden mit sehr geringer Intensität zu erkennen. Diesbezüglich wurden verschiedene Parameter: Detergens, Detergens/Chlorophyll-Verhältnis, Puffer untersucht, auch eine Anpassung des Protokolls zur Solubilisierung lieferte keine Lösung für dieses Problem. Hema *et al.*^[10] konnten zeigen, dass höhere Temperaturen (oberhalb von 39 °C) zu einer Beeinträchtigung des Wachstums und zu einer Degradation der Chlorophyll enthaltenden Proteine führen kann. Die Algenkultur wurde für 1 Stunde einer Temperatur von 39 °C ausgesetzt und danach das weitere Wachstum bei 25 °C untersucht^[10]. Ähnliche Beobachtungen lassen sich auch bei Xie *et al.*^[230] finden. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten (M6P₃₄) erfolgte das Wachstum von *C. reinhardtii* für einen Tag bei einer Temperatur von 22 °C und für 3 Tage bei 34 °C. Schon während der Isolierung der Mitochondrien war zu beobachten, dass diese Fraktionen nur eine schwach grüne bis leicht braune Farbe besitzen. Dies deutet darauf hin, dass die Algen eine ähnliche Morphologie, wie von Hema *et al.*^[10] beschrieben, zeigen und ein Abbau von mitochondrialen und chloroplastidären Proteine stattgefunden hat. Daher wird bei den im Folgenden gezeigten Aktivitätstests nicht näher auf die Ergebnisse von M6P₃₄ eingegangen.

Bei M1P₂₂, M2P₂₈ und M5P₃₁ können im oberen Bereich des Gels die Banden für das mitochondriale Dimer der ATP-Synthase und die Superkomplexe $I_1III_2IV_1$ (S1) und $I_1III_2IV_2$ (S2) zugeordnet werden. Die Bande für das Dimer V₂ zeigt bei diesen Proben eine deutlich höhere Intensität im Vergleich zu den Superkomplexen (in diesem Bereich). Bei einem Vergleich zwischen S1 und S2 ist zu erkennen, dass bei M1P₂₂ die Bande für S1 eine höhere Intensität besitzt, bei M2P₂₈ und M5P₃₁ trifft dies auf S2 zu. Oberhalb von S2 ist bei M1P₂₂ eine weitere Bande (roter Pfeil) mit sehr geringer Intensität zu sehen, möglicherweise handelt es sich um einen Superkomplex mit einem höherem Assemblierungsgrad. Bei M2P₂₈ und M5P₃₁ ist in diesem Bereich keine Bande zu finden. Sowohl der individuelle Komplex I₁ als auch IV₁ zeigen bei den Proben nur eine sehr geringe Farbeintensität. Dies lässt die Vermutung zu, dass in der Alge *C. reinhardtii* die Amtungskettenkomplexe I und IV hauptsächlich in Superkomplexen gebunden sind. Eine Bande für den individuellen Komplex III₂ kann nicht zweifelsfrei gefunden werden, da im Bereich zwischen 440 und 669 kDa sehr viele Banden mit unterschiedlichen Intensitäten zu sehen sind. Hierbei handelt es sich um Proteinkomplexe aus Chloroplasten, die Lichtsammelkomplexe I und II, die chloroplastidäre ATP-Synthase und Rubisco, die als Verunreinigung in allen Mitochondrienfraktionen auftreten^[231].

Durch den In-Gel Aktivitätstest von Komplex I (Abbildung 5.71 B) kann für M1P₂₂, M2P₂₈ und M5P₃₁ eine enzymatische Dehydrogenase-Aktivität des individuellen Komplexes I₁ und der Superkomplexe $I_1III_2IV_1$ (S1) und $I_1III_2IV_2$ (S2) nachgewiesen werden. Während bei den

mitochondrialen Proteinen aus der Anzucht bei 22 °C die Bande für den individuellen Komplex I₁ sehr stark ausgeprägt ist, zeigt die Bande von I₁ bei M2P₂₈ bzw. M5P₃₁ eine deutlich geringere Menge des violetten Präzipitats Formazan. Betrachtet man die Superkomplexe S1 und S2, dann ist zu erkennen, dass bei M1P₂₂ S1 und S2 eine ähnliche Intensität besitzen, bei M2P₂₈ bzw. M5P₃₁ weist S2 eine etwas höhere Intensität im Vergleich zu S1 auf. Dadurch stellt sich die Frage, ob die höheren Temperaturen während des Wachstums entweder zu einem verstärkten Einbau von individuellem Komplex I₁ in die Superkomplexe S1 und S2 geführt haben oder es aufgrund dieser Temperaturen zu einer Denaturierung von I₁ gekommen ist. Für die erste Überlegung würde auch die Beobachtung sprechen, dass bei M2P₂₈ und M5P₃₁ der Superkomplex S2 eine stärkere Intensität besitzt. Oberhalb von S2 (roter Pfeil) ist bei M1P₂₂ eine violette Bande zu erkennen, es handelt sich vermutlich, wie oben beschrieben, um einen Superkomplex mit einem höherem Assemblierungsgrad, z.B. I₁III₂IV₃. Bei den anderen Proben tritt diese Bande auch auf, besitzt allerdings eine deutlich geringere Intensität. Darüber hinaus zeigen weitere Banden (blauer Pfeil) bei allen drei Proben eine Dehydrogenase-Aktivität. Da diese Banden noch weiter oben im Gel auftreten, handelt es sich entweder um weitere Assemblierungen von Superkomplexen oder um Proteinaggregate, die teilweise in den großporigen Bereich des Trenngels eingelaufen sind.

Eine weitere Charakterisierung der OxPhos-Komplexe erfolgt anhand des In-Gel Aktivitätstests von Komplex IV (Abbildung 5.71 C). Dadurch kann nachgewiesen werden, dass die Superkomplexe S1 und S2 in den hier untersuchten mitochondrialen Solubilisaten auch eine Komplex-IV-Aktivität besitzen. Bei M1P₂₂ zeigen S1 und S2 eine ähnlich starke Präzipitatbildung, bei M2P₂₈ und M5P₃₁ weist der Superkomplex S2 eine deutlich höhere Intensität als S1 auf. Dieser Unterschied war schon bei dem vorherigen Aktivitätstest für Komplex I zu beobachten, allerdings ist er bei dem Test für Komplex IV deutlich stärker ausgeprägt. Der Proteinkomplex oberhalb von Superkomplex S2 (roter Pfeil) zeigt keine Komplex-IV-Aktivität. Wahrscheinlich handelt es sich um einen Superkomplex, der nur aus den Komplexen I und III aufgebaut ist (z.B. I₂III₂). Lapuente-Brun *et al.*^[171] konnten diesen Komplex bei Mitochondrien aus Mausfibroblasten nachweisen. Ähnliche Assemblierungen wurden von Krause *et al.*^[62] für den Pilz *Podospira anserina* gefunden. Hierbei handelte es sich um Mutanten des Pilzes, bei denen anstatt von Komplex IV eine alternative Oxidase, welche die Elektronentransportkette von Komplex III und IV umgeht, bevorzugt exprimiert wurde.

Der individuelle Komplex IV₁ ist sowohl bei M1P₂₂ als auch bei M2P₂₈ und M5P₃₁ zu finden, das gebildete braune Präzipitat DAB zeigt bei den Proben eine ähnliche Intensität. Bei einem Vergleich dieser Solubilisate mit BHM ist zu erkennen, dass bei *C. reinhardtii* weder Homooligomere von Komplex IV (IV₂, IV₃) noch Superkomplexe, die aus Komplex III und IV aufgebaut sind (z.B. III₂IV₁), auftreten.

5.2.2.2 Photoautotrophes Wachstum

Die Analyse der mitochondrialen Solubilisate aus *C. reinhardtii* bei verschiedenen Anzuchttemperaturen (22 und 28 °C) wird mittels BN-PAGE durchgeführt. Das Wachstum der Algen erfolgte photoautotroph (HS-Medium, Abschnitt 4.2), die Probenbezeichnungen sind Tabelle 5.15 zu entnehmen. Pro Spur wurden jeweils 30 µg Protein (vor Solub., bezogen auf die Chlorophyll-Konzentration, Digitonin/Chlorophyll-Verhältnis von 40 g/g) auf ein großes BN-Gel aufgetragen. Die optimalen Digitonin/Chlorophyll-Verhältnisse wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Stefani Kemski^[232] ermittelt.

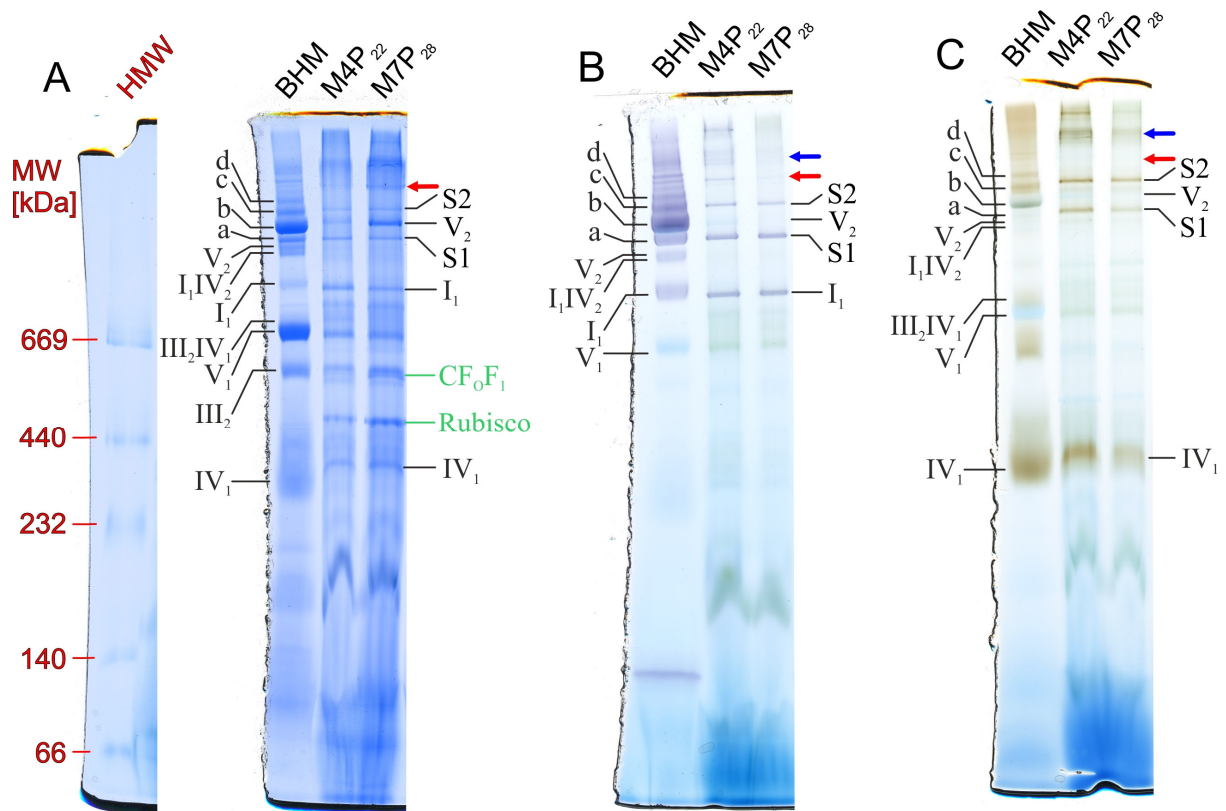


Abbildung 5.72: Zuordnung der Proteinbanden von solubilisierten Mitochondrien aus *C. reinhardtii* bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen (22, 28 °C, photoautotroph) auf einem Coomassie-gefärbten BN-Gel (A), in einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (B) und für Komplex IV (C). Es wurden pro Spur jeweils 30 µg Protein (vor Solub., bezogen auf die Chlorophyll-Konzentration, Digitonin/Chlorophyll-Verhältnis von 40 g/g) von den mitochondrialen Präparationen (photoautotroph) bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen (M4P₂₂, M7P₂₈) auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Für das Coomassie-gefärbte Gel wurden 4 µL des HMW-Markers (rot) auf das Gel als Proteinmassenstandard aufgetragen und es wurde BHM (100 µg vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 3 g/g) als Standard verwendet. Die farbigen Pfeile (rot und blau) deuten auf Banden hin, die nur bedingt zugeordnet werden können. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: S1 = I₁III₂IV₁, S2 = I₁III₂IV₂ bzw. für BHM a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

Für die Zuordnung der Proteinbanden sei auf Heidrich^[133], Schwassmann *et al.*^[84] und Reifschneider^[94] verwiesen. Die Bezeichnung der Banden von BHM wurde entsprechend Abschnitt 5.1.2.1 vorgenommen. Anhand des Coomassie-gefärbten Gelbildes (Abbildung 5.72 A) können bei M4P₂₂ und M7P₂₈ die Superkomplexe I₁III₂IV₁ (S1) und I₁III₂IV₂ (S2), das mitochondriale Dimer der ATP-Synthase und der individuelle Komplex I₁ und IV₁

zugewiesen werden. Vergleich man im Bereich der Superkomplexe die Intensitäten der Proteinbanden von beiden Proben, dann ist zu erkennen, dass bei M7P₂₈ die Banden eine deutlich höhere Intensität besitzen. Bei M4P₂₂ weisen die Banden für die Superkomplexe S1, S2 und das Dimer V₂ eine ähnlich starke Coomassie-Färbung auf. Bei M7P₂₈ ist zu erkennen, dass die Bande für V₂ eine höhere Intensität als die Superkomplexe besitzt. Im Gegensatz zu dem in Abbildung 5.71 A dargestellten BN-Gel treten bei den Algen, die unter photoautotrophen Bedingungen gewachsen sind, keine Unterschiede zwischen der Intensität der Banden für die Superkomplexe S1 und S2 auf. Oberhalb von S2 ist bei beiden Proben eine weitere Bande zu sehen (roter Pfeil). Die Coomassie-Färbung des individuellen Komplexes I₁ ist bei M4P₂₂ und M7P₂₈ ähnlich stark ausgeprägt. Im Bereich zwischen 440 und 669 kDa sind auch Proteinkomplexe aus Chloroplasten zu finden, die ATP-Synthase, Rubisco und Proteine der Lichtsammelkomplexe I und II. Dies erschwert die Zuordnung der Banden für den individuellen Komplex III₂. Des Weiteren zeigt der individuelle Komplex IV₁ bei M4P₂₂ und M7P₂₈ eine ähnlich hohe Intensität.

In Abbildung 5.72 B ist ein In-Gel Aktivitätstest für Komplex I dargestellt. Bei den Solubilisaten beider Proben zeigen der individuelle Komplex I₁ und die Superkomplexe S1 und S2 die Bildung des violetten Präzipitats Formazan. Sowohl bei M4P₂₂ als auch M7P₂₈ besitzen die Banden für S1 eine deutlich höhere Intensität als der Superkomplex S2. Im Gegensatz zu dem in Abbildung 5.71 B gezeigten Aktivitätstest (photomixotrophes Wachstum) ist demnach kein temperaturabhängiger Unterschied zwischen der Präzipitatbildung der Superkomplexe zu erkennen. Ebenso ist auffällig, dass der individuelle Komplex I₁ bei M4P₂₂ und M7P₂₈ eine ähnlich starke Färbung aufweist. Die Bande im hochmolekularen Bereich (roter Pfeil) zeigt auch eine Dehydrogenase-Aktivität. Im Vergleich zwischen den beiden Proben ist die Präzipitatbildung bei M4P₂₂ stärker ausgeprägt. Im darüber liegenden Bereich sind weitere Banden (blauer Pfeil) mit geringerer Intensität zu sehen.

Anhand des In-Gel Aktivitätstests für Komplex IV (Abbildung 5.72 C) kann nachgewiesen werden, dass die Superkomplexe S1 und S2 eine Cytochrom-*c*-Oxidase-Aktivität besitzen. Während bei M4P₂₂ S1 und S2 ähnliche Intensitäten besitzen, ist bei M7P₂₈ der Superkomplex S2 stärker braun gefärbt im Vergleich zu S1. Die Bande für den individuellen Komplex IV₁ zeigt bei M4P₂₂ eine etwas höhere Intensität als bei M7P₂₈. Die Bande im hochmolekularen Bereich (roter Pfeil) zeigt keine Aktivität. Es könnte sich, wie in Abschnitt 5.2.2.1 beschrieben, um einen Superkomplex handeln, der nur aus Komplex I und III zusammengesetzt ist (z.B. I₂III₂) oder um ein Dimer aus Komplex I. Aufgrund der Lage im oberen Bereich des Trenngels sollte diese Assemblierung eine Masse zwischen 2 und 3 MDa besitzen. Im Bereich darüber zeigen weitere Banden eine Komplex-IV-Aktivität (blauer Pfeil). Es könnte sich hierbei um Superkomplexe mit einem höheren Assemblierungsgrad oder Proteinaggregate handeln. Für eine genaue Charakterisierung sind daher weitere Experimente notwendig.

5.2.3 Quantitativer In-Gel Aktivitätstest für Komplex I und IV

Für die quantitative Auswertung der im Folgenden gezeigten Ergebnisse der In-Gel Aktivitätstests für Komplex I und IV der OxPhos-Komplexe aus *C. reinhardtii* bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen sei auf Abschnitt 5.1.3.1 (Seite 62) verwiesen. Nach beendeter Elektrophorese wurde das BN-Gel in einer Färbeschale mit Aktivitätstest-Lösung inkubiert und zu festgelegten Zeitpunkten wurde ein 16-bit Graustufenbild (Auflösung 600 dpi) mit dem Bio-Imaging-System ViewPix 900 aufgenommen. Die Zeitpunkte für den Komplex I- bzw. Komplex IV-Aktivitätstest sind dem oben erwähnten Abschnitt zu entnehmen. Die weitere Auswertung der Graustufenbilder erfolgte mit der Software Delta2D. Die Normierung der erhaltenen Daten wurde wie in Abschnitt 4.11.2 (Seite 47) durchgeführt. Anschließend wurden die normierten Werte gegen die Zeit aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Die Steigungen dieser Geraden stellen die relative spezifische Aktivität der entsprechenden Proteinbanden in der Einheit $\text{GU}_{\text{normiert}}$ pro Minute dar. Aus den erhaltenen Aktivitäten dieser Replikate werden die Mittelwerte berechnet und als Balkendiagramme dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler dar. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Ein statistisch signifikanter Unterschied wird mit stat. sig. abgekürzt, ein nicht signifikanter Unterschied mit stat. n. sig..

5.2.3.1 Photomixotrophes Wachstum

Die Zuordnung der Proteinbanden für die Aktivitätstests von Komplex I und IV wurde bereits in Abschnitt 5.2.2.1 (Abbildung 5.71) dargestellt. Die Gelbilder, die für die Auswertung herangezogen wurden, sind im Anhang Abbildung 8.18 gezeigt. Es wurden pro Spur (jeweils 3 technische Replikate) 30 μg Protein (vor Solub., bezogen auf die Chlorophyll-Konzentration, Digitonin/Chlorophyll-Verhältnis von 40 g/g) von den mitochondrialen Präparationen (photomixotroph) bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen (M1P₂₂, M2P₂₈, M5P₃₁) auf ein großes BN-Gel aufgetragen. Für die Ermittlung des Digitonin/Chlorophyll-Verhältnisses sei auf die Bachelorarbeit von Daniela Goedderz^[228] verwiesen.

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Temperatur (während der Wachstumsphase) die Assemblierungen der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe beeinflusst. Im Folgenden soll der Einfluss dieses Parameters auf die enzymatische Aktivität der individuellen Komplexe und der Superkomplexe analysiert werden.

Die relativen spezifischen Aktivitäten des individuellen Komplex I₁ und der Superkomplexe I₁III₂IV₁ (S1) und I₁III₂IV₂ (S2) sind in Abbildung 5.73 A dargestellt. Für den Komplex I₁ besitzt M1P₂₂ die höchste spezifische Aktivität, im Vergleich zu M2P₂₈ ist sie um den Faktor 1,96 (stat. sig.) und zu M5P₃₁ um den Faktor 1,16 (stat. n. sig.) aktiver. Bei den Superkomplexen S1 und S2 zeigt M5P₃₁ die mit Abstand höchste Aktivität (Vgl. M1P₂₂, stat. sig.). Bei den Solubilisaten aus M2P₂₈ ist die Aktivität für den Superkomplex S1 um den Faktor 0,13 niedriger (Vgl. M1P₂₂, stat. n. sig.) und für Superkomplex S2 um den Faktor 1,35 höher (Vgl. M1P₂₂, stat. sig.).

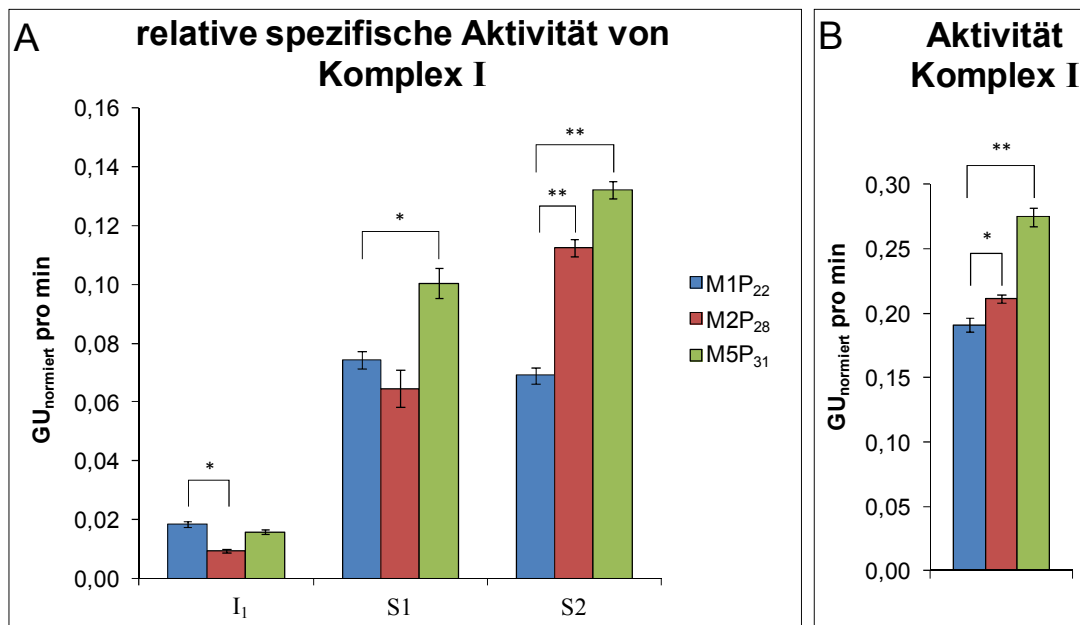


Abbildung 5.73: relative spezifische Komplex-I-Aktivitäten (A) des individuellen Komplexes I₁ und der Superkomplexe I₁III₂IV₁ (S1) und I₁III₂IV₂ (S2) und die Gesamtaktivität für Komplex I (B) von M1P₂₂, M2P₂₈ und M5P₃₁. Es handelt sich hierbei um die mitochondrialen Proben aus dem photomixotrophen Wachstum bei 22, 28 und 31 °C. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang (Abbildung 8.18 A). Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate (n = 3) der spezifischen Aktivitäten in Graustufenwerten pro Minute (GU_{normiert} pro min). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler der Replikate. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt festgelegt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Der schwarze Stern zeigt den Vergleich mit M1P₂₂ (M1P₂₂ vs M2P₂₈, M1P₂₂ vs M5P₃₁).

Vergleicht man die spezifischen Aktivitäten des individuellen Komplexes I₁ mit den Aktivitäten der Superkomplexe S1 und S2, dann ist zu erkennen, dass bei allen Proben die Superkomplexe eine deutlich höhere Aktivität besitzen. Für den Superkomplex S1 und S2 bedeutet dies bei M1P₂₂ eine um den Faktor 3,86, bei M2P₂₈ eine um den Faktor 9,39 und bei M5P₃₁ eine um den Faktor 7,29 höhere Aktivität. Bei den gezeigten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte von S1 und S2. Die gleiche Tendenz war auch bei den quantitativen Aktivitätstests für die OxPhos-Komplexe aus tierischem Gewebe (Abschnitt 5.1.3) zu beobachten. Dort zeigte sich bei BHM, DHM, PHM und WHM für die Superkomplexe a, c und d, dass die Aktivität um das 1,46 bis 2,41-fache im Vergleich zum individuellen Komplex zunahm. Bei den Proben aus Maus und Ratte lagen die Steigerungen der Aktivität in einem Bereich um den Faktor 1,75 bis 4,75. Bei der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe zu Superkomplexen handelt es sich um ein hoch konserviertes Strukturmotiv, dass sowohl bei der einzelligen Grünalge *C. reinhardtii* als auch bei höheren Säugetieren zu finden ist. Ebenso ist bei diesen unterschiedlichen Organismen zu beobachten, dass die Superkomplexe im Vergleich zu den individuellen Komplexen eine deutlich höhere spezifische Aktivität besitzen.

Die Gesamtaktivität von Komplex I ist in Abbildung 5.73 B dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Solubilisate von M5P₃₁ die mit Abstand höchste spezifische Aktivität aufweisen (Faktor 1,44, stat. sig.). Im Vergleich zu M1P₂₂ zeigt M2P₂₈ eine 1,11-fach so hohe Aktivität (stat. sig.). Die Daten zeigen, dass die Erhöhung der Temperatur während des Wachstums bei

C. reinhardtii zu einer Steigerung der Aktivität führt. Besonders bei der Anzucht bei 31 °C ist ein deutlich Unterschied zu sehen.

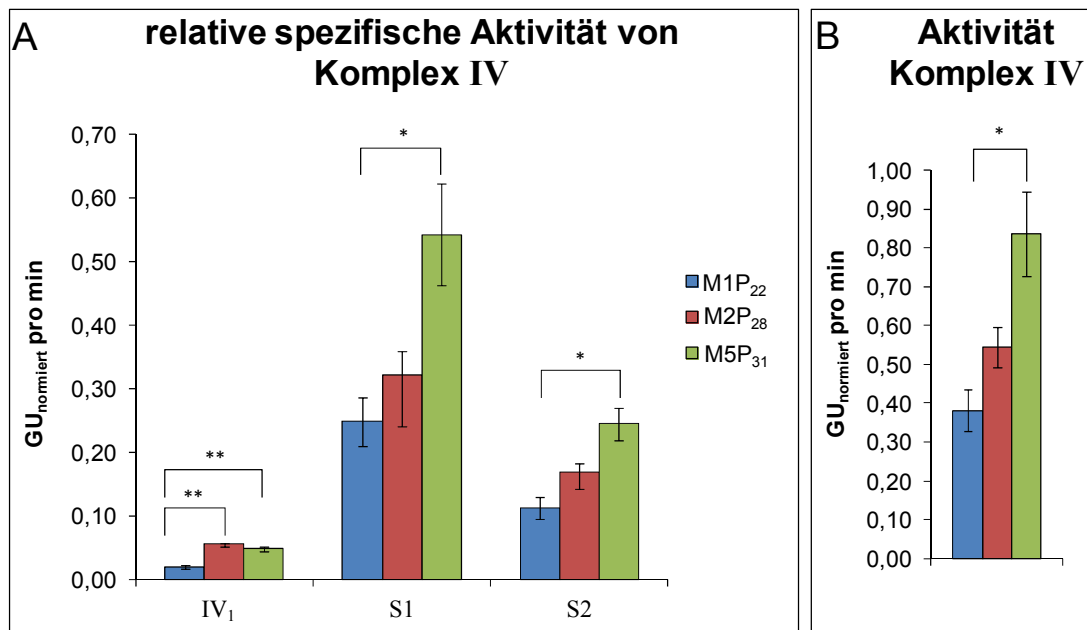


Abbildung 5.74: relative spezifische Komplex-IV-Aktivitäten (A) des individuellen Komplexes IV₁ und der Superkomplexe I₁III₂IV₁ (S1) und I₁III₂IV₂ (S2) und die Gesamtaktivität für Komplex IV (B) von M1P₂₂, M2P₂₈ und M5P₃₁. Weitere Angaben sind identisch mit Abbildung 5.73.

Die relativen spezifischen Aktivitäten des In-Gel Komplex-IV-Aktivitätstests sind in Abbildung 5.74 A gezeigt. Für den individuellen Komplex IV₁ zeigen M2P₂₈ und M5P₃₁ nahezu identische Werte, im Vergleich zu M1P₂₂ ist die Aktivität um den Faktor 2,60 höher (Mittelwert, stat. sig.). Bei den Superkomplexen S1 und S2 ist ein ähnlicher Trend wie bei dem Komplex-I-Aktivitätstest zu beobachten, M5P₃₁ besitzt die höchste spezifische Aktivität. Im Vergleich zu M1P₂₂ bedeutet dies für die Superkomplexe eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 2,17 (stat. sig., Mittelwert). Auch bei M2P₂₈ ist eine Zunahme der Aktivität zu erkennen, bei Superkomplex S1 um das 1,29-fache und bei Superkomplex S2 um das 1,49-fache (in beiden Fällen stat. n. sig.).

Im Folgenden sollen die relativen spezifischen Aktivitäten zwischen dem individuellen Komplex IV₁ und den Superkomplexen verglichen werden. Der Superkomplex S1 besitzt die mit Abstand höchste spezifische Aktivität. Im Vergleich zu dem individuellen Komplex bedeutet dies bei M1P₂₂ eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 12,46, bei M2P₂₈ um den Faktor 5,78 und bei M5P₃₁ um den Faktor 11,20. Der Superkomplex S2 zeigt eine geringere Zunahme der spezifischen Aktivität, bei M1P₂₂ um das 5,64-fache, bei M2P₂₈ um das 3,03-fache und bei M5P₃₁ um das 5,06-fache. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei den Superkomplexen aus tierischem Gewebe gefunden (siehe Abschnitt 5.1.3).

In Abbildung 5.74 B ist die aus diesen Daten summierte Gesamtaktivität für Komplex IV dargestellt. Wie erwartet zeigt sich bei M5P₃₁ eine deutlich höhere Aktivität (stat. sig.) im Vergleich zu den OxPhos-Komplexen aus den Mitochondrien unter Standardbedingungen

($T = 22\text{ °C}$). Bei M2P₂₈ ist eine geringere Zunahme der Aktivität zu sehen. Wie auch für den Komplex-I-Aktivitätstest führt eine Erhöhung der Temperatur während des Wachstums zu einer Steigerung der spezifischen Aktivität bei Komplex IV.

5.2.3.2 Photoautotrophes Wachstum

Die Zuordnung der Proteinbanden für die Aktivitätstests von Komplex I und IV wurde bereits in Abschnitt 5.2.2.2 (Abbildung 5.72) dargestellt. Da die Ausbeute an Mitochondrien von *C. reinhardtii* bei photoautotrophem Wachstum sehr gering war, konnten für den Komplex I-Aktivitätstest nur 2 technische Replikate und für den Komplex-IV-Aktivitätstest nur 1 technisches Replikat verwendet werden. Das für diese Auswertung verwendete Gel für den Komplex-IV-Test ist im Anhang Abbildung 8.19, für den Komplex-I-Test in Abbildung 5.72 C gezeigt. Es wurden pro Spur 30 µg Protein (vor Solub., bezogen auf die Chlorophyll-Konzentration, Digitonin/Chlorophyll-Verhältnis von 40 g/g) von den mitochondrialen Präparationen (photoautotroph) bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen (M4P₂₂, M7P₂₈) auf ein großes BN-Gel aufgetragen. Für die Ermittlung des Digitonin/Chlorophyll-Verhältnisses sei auf die Masterarbeit von Stefani Kemski^[232] verwiesen. Aufgrund der begrenzten Anzahl an Replikaten konnte für die im Folgenden gezeigten Daten kein Student's t-Test durchgeführt werden.

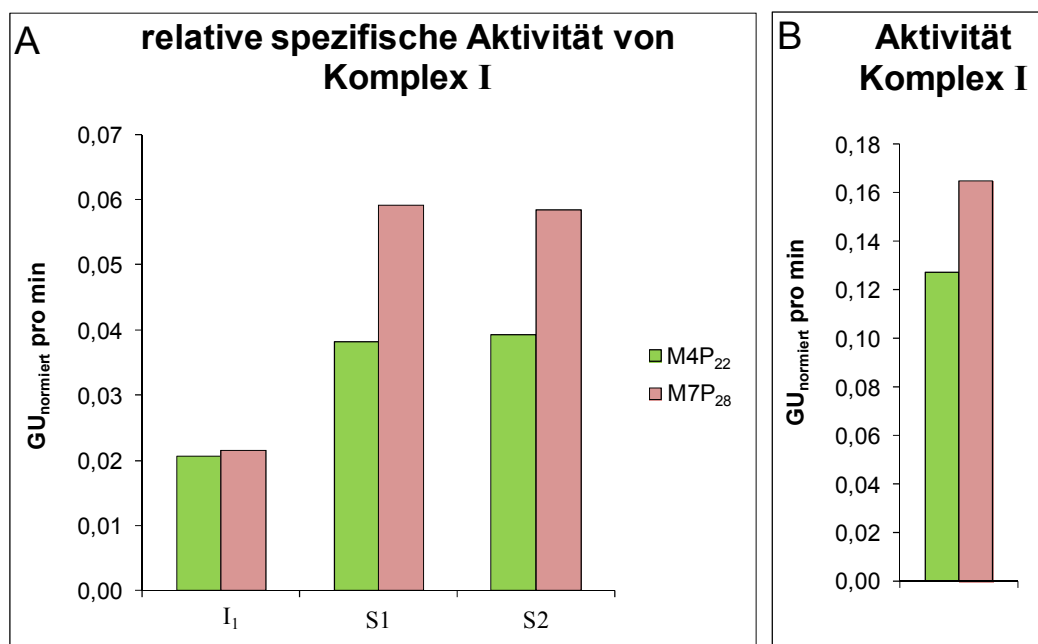


Abbildung 5.75: relative spezifische Komplex-I-Aktivitäten (A) des individuellen Komplexes I₁ und der Superkomplexe I₁III₂IV₁ (S1) und I₁III₂IV₂ (S2) und die Gesamtkomplex I (B) von M4P₂₂ und M7P₂₈. Es handelt sich hierbei um die mitochondrialen Proben aus dem photoautotrophen Wachstum bei 22 und 28 °C. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt im Anhang (Abbildung 8.19).

Die relativen spezifischen Aktivität des Komplex-I-Aktivitätstests sind in Abbildung 5.75 A gezeigt. Für den individuellen Komplex I₁ besitzen beide Proben nahezu identische Werte, bei

Superkomplex S1 und S2 weist M7P₂₈ im Vergleich zu M4P₂₂ eine um den Faktor 1,52 höhere Aktivität (Mittelwert) auf.

Ein Vergleich der Aktivitäten des individuellen Komplexes I₁ mit den Superkomplexen zeigt eine deutliche Zunahme in den Aktivitäten, wie bereits bei den Atmungskettenkomplexen unter photomixotrophem Wachstumsbedingungen (Abschnitt 5.2.3.1) zu sehen war. Bei M4P₂₂ ist für die Superkomplex S1 und S2 eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 1,90, bei M7P₂₈ sogar um das 2,7-fache zu beobachten. Hierbei scheint eine Erhöhung der Temperatur während des Wachstums zu einer Zunahme der spezifischen Aktivität bei den Superkomplexen zu führen. Dementsprechend ist auch bei der Gesamtaktivität von Komplex I diese Zunahme zu sehen (Abbildung 5.75 B).

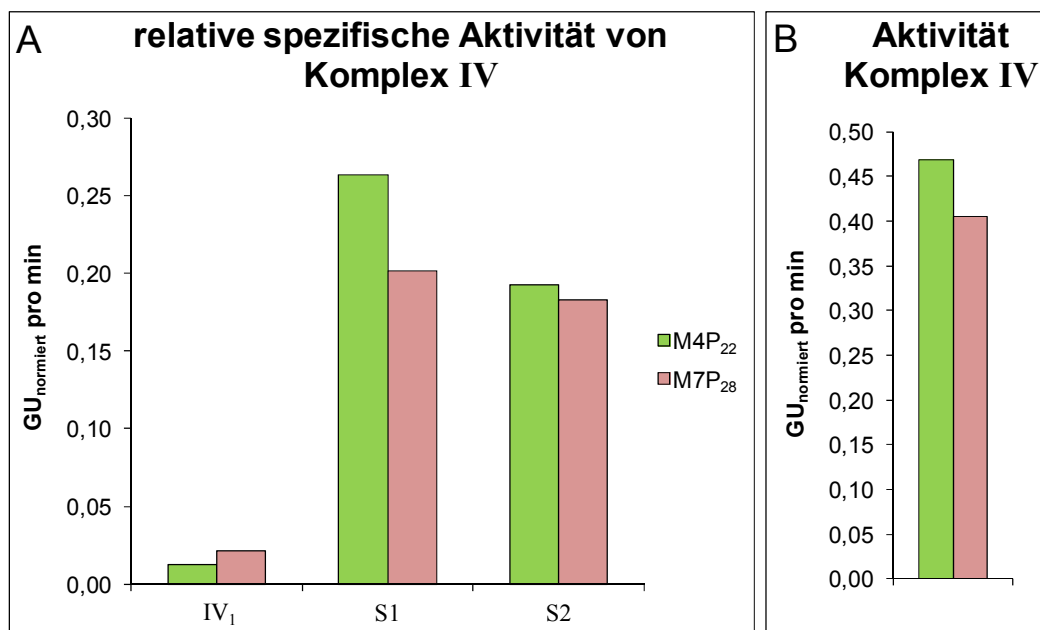


Abbildung 5.76: relative spezifische Komplex-IV-Aktivitäten (A) des individuellen Komplexes IV₁ und der Superkomplexe I₁III₂IV₁ (S1) und I₁III₂IV₂ (S2) und die Gesamtaktivität für Komplex IV (B) von M4P₂₂ und M7P₂₈. Es handelt sich hierbei um die mitochondrialen Proben aus dem photoautotrophen Wachstum bei 22 und 28 °C. Ausgewertet wurde der In-Gel Aktivitätstest gezeigt in **Abbildung 5.72 C**.

In Abbildung 5.76 A sind die relativen spezifischen Komplex-IV-Aktivitäten dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Superkomplex S1 bei M4P₂₂ eine höhere spezifische Aktivität (Faktor 1,31) besitzt. Bei Superkomplex S2 und bei dem individuellen Komplex IV₁ sind die Werte bei beiden Proben sehr ähnlich. Bei der Gesamtaktivität für Komplex IV zeigt M4P₂₂ ein um den Faktor 1,15 höhere spezifische Aktivität als M7P₂₈ (Abbildung 5.76 B). Im Gegensatz zu den vorher gezeigten Diagrammen führt hier eine Erhöhung der Temperatur während des Wachstums (von 22 °C auf 28 °C) zu einer Erniedrigung der spezifischen Aktivität von Komplex IV. Da für die Auswertung des Aktivitätstests nur ein 1 technisches Replikat verwendet worden ist, sollte dieses Ergebnis sehr kritisch betrachtet werden. Um herauszufinden, ob es sich hierbei nur eine Anomalie bedingt durch die Solubilisierung oder die Aktivitätstest-Lösung handelt, müssten daher noch weitere Experimente durchgeführt werden.

Bei einem Vergleich der relativen spezifischen Aktivität des individuellen Komplexes IV₁ und der Superkomplexe ist ähnlich wie unter photomixotrophem Wachstum folgendes zu beobachten: Der Superkomplex S1 besitzt die höchste spezifische Aktivität. Für M4P₂₂ bedeutet dies eine Zunahme um den Faktor 21,63 und für M7P₂₈ um den Faktor 9,32. Bei dem Superkomplex S2 fällt diese Steigerung der Aktivität etwas schwächer aus, bei M4P₂₂ um das 15,81-fache und bei M7P₂₈ um das 8,46-fache.

5.2.3.3 Zusammenfassung

Für die Quantitative Analyse der In-Gel Aktivitätstests für Komplex I und IV wurden die Proben aus photomixotropher Anzucht M1P₂₂, M2P₂₈ und M5P₃₁ der Grünalge *C. reinhardtii* verwendet. Da bei M6P₃₄ die Banden nicht eindeutig zugeordnet werden konnten (Abschnitt 5.2.2), wurde es bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Bei der Komplex-I-Aktivität kann gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Temperatur während des Wachstums zu einer Steigerung der relativen spezifischen Gesamtaktivität führt. Bei dieser Gesamtaktivität handelt es sich um eine Summe der spezifischen Aktivitäten von dem individuellen Komplex I und den Superkomplexen I₁III₂IV₁ (S1) und I₁III₂IV₂ (S2). Während bei dem individuellen Komplex I nur geringe Unterschiede auftreten, ist besonders bei S1 und S2 eine deutliche Steigerung der Aktivität zu sehen. Besonders bei M5P₃₁ ist dieser Unterschied sehr gut zu erkennen, dort besitzt S2 eine doppelt so hohe Aktivität (Faktor 1,95, stat. sig.) wie M1P₂₂. Auch bei dem Aktivitätstest für Komplex IV ist ein ähnlicher Trend zu beobachten. Bei einem Vergleich der Gesamtaktivitäten zeigt M5P₃₁ ebenfalls eine doppelt so hohe Aktivität (Faktor 2,19, stat. sig.) wie M1P₂₂. Bei M2P₂₈ tritt eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 1,43 (stat. n. sig.) auf.

Für photoautotrophes Wachstum wurden die Aktivitätstests der Proben M4P₂₂ und M7P₂₈ quantitativ analysiert. Da die Ausbeute an Mitochondrien nur sehr gering war, konnten für den Komplex-I-Aktivitätstest nur 2 technische Replikate und für den Komplex-IV-Aktivitätstest nur 1 technisches Replikat verwendet werden. Bei dem Aktivitätstest für Komplex I ist der bereits oben beschriebene Trend zu beobachten. Die relativen spezifischen Aktivitäten für den individuellen Komplex I₁ sind identisch, bei S1 und S2 besitzt M7P₂₈ eine im Mittel um den Faktor 1,52 höhere Aktivität. Dementsprechend ist auch bei der Gesamtaktivität eine Steigerung der Aktivität zu sehen. Der Komplex-IV-Aktivitätstest zeigt im Gegensatz zu den vorher dargestellten Ergebnissen eine andere Tendenz bei den relativen spezifischen Aktivitäten der untersuchten Proben. Während M4P₂₂ und M7P₂₈ für den individuellen Komplex IV₁ und den Superkomplex S2 ähnliche Aktivitäten aufweisen, besitzt für Superkomplex S1 M4P₂₂ eine um den Faktor 1,31 höhere Aktivität. Die Temperatur hätte demnach nur einen geringen Einfluss auf die Komplex-IV-Aktivität von S2 und bei S1 ist sogar eine Verringerung der Aktivität zu beobachten. Da für diesen Test nur ein technisches Replikat verwendet worden ist, können die hier gezeigten Ergebnisse nur Tendenzen aufzeigen. Um zu überprüfen, ob es sich um statistisch signifikante Unterschiede handelt, müssten daher weitere Experimente durchgeführt werden.

Bei einem Vergleich der relativen spezifischen Aktivitäten zwischen dem individuellen Komplex I₁ bzw. IV₁ und den Superkomplexen I₁III₂IV₁ (S1) und I₁III₂IV₂ (S2) ist bei allen Proben zu beobachten, dass eine Assemblierung der OxPhos-Komplexe zu Superkomplexen zu einer deutlichen Zunahme der spezifischen Aktivität führt (Tabelle 5.16). Für Komplex I ist dies bei den photomixotrophen Proben (M1P₂₂, M2P₂₈, M5P₃₁) besonders stark ausgeprägt, für Komplex IV ist dies bei den photoautotrophen Proben (M4P₂₂, M7P₂₈) sehr gut zu erkennen. Ähnliche Resultate traten auch bei den OxPhos-Komplexen aus unterschiedlichen Säugetieren (Abschnitt 5.1.3) auf. Thilmany^[95], Kratochwil^[3] und Kuter *et al.*^[159] haben bei den Atmungskettenkomplexen aus Fischerratten ebenfalls herausgefunden, dass eine Assemblierung zu Superkomplexen zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität führt. Muschol^[160] konnte dies auch für den Pilz *Podospira anserina* nachweisen. Aus der Anordnung der individuellen Komplexe zu Superkomplexen ergeben sich noch weitere Vorteile. Aufgrund der räumlichen Nähe dieser Komplexe müssen die Elektronentransporter Cytochrom *c* und Ubichinon nur kurze Wegstrecken zwischen den reaktiven Zentren zurücklegen. Des Weiteren haben zahlreiche Experimente gezeigt^[23, 170, 171], dass in den Superkomplexen die Menge an gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) niedriger ist. Neben ihrer Funktion bei der Signalübertragung zwischen Zellen stehen diese Klasse von Molekülen im Verdacht eine entscheidende Rolle bei den Vorgängen des Alterns und Alters-assoziierten Krankheiten zu spielen^[233, 234]. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Stabilität der Superkomplexe. Untersuchungen von Li *et al.*^[168] und Acin-Perez *et al.*^[169] deuten darauf hin, dass die Komplexe III₂ und IV₁ für die Assemblierung und Stabilität von Komplex I verantwortlich sind. Es könnte sich daher bei den Superkomplexen um ein hoch konserviertes Strukturmotiv handeln, dass bei Mitochondrien sowohl in einfachen als auch in komplexeren Organismen auftritt.

Tabelle 5.16: Vergleich der relativen spezifischen Aktivitäten des individuellen Komplexes I₁ bzw. IV₁ mit den Superkomplexen I₁III₂IV₁ (S1) und I₁III₂IV₂ (S2). Gezeigt sind die Steigerungen der spezifischen Aktivität normiert auf den jeweiligen individuellen Komplex I₁ bzw. IV₁ für die Proben aus photomixotropher (M1P₂₂, M2P₂₈, M5P₃₁) und photoautotropher Aufzucht (M4P₂₂, M7P₂₈).

Komplex I	I ₁ III ₂ IV ₁ (S1)	I ₁ III ₂ IV ₁ (S2)
M1P ₂₂	4,00	3,72
M2P ₂₈	6,86	11,93
M5P ₃₁	6,30	8,28
M4P ₂₂	1,85	1,90
M7P ₂₈	2,74	2,70

Komplex IV	I ₁ III ₂ IV ₁ (S1)	I ₁ III ₂ IV ₁ (S2)
M1P ₂₂	12,46	5,64
M2P ₂₈	5,78	3,03
M5P ₃₁	11,20	5,06
M4P ₂₂	21,63	15,81
M7P ₂₈	9,32	8,46

5.2.4 Identifizierung von Proteinen in 2-D BN/SDS-Gelen

Für die Identifizierung von Proteinen in 2-D BN/SDS-Gelen wurden 140 µg Protein (vor Solub., bezogen auf die Chlorophyll-Konzentration, Digitonin/Chlorophyll-Verhältnis von 40 g/g) von M1P₂₂ verwendet. Es handelte sich hierbei um ein Solubilisat der Mitochondrien von *Chlamydomonas reinhardtii* bei photomomixotrophem Wachstum (bei 22 °C). Als Proteinmassenstandard wurde der LMW-Marker auf das Gel aufgetragen. Wie in Abschnitt 4.10 beschrieben, wurden die 2-D Gele nach beendeter Elektrophorese mit Silber gefärbt und die Proteinspots mit einer Hautstanze (Ø 2,0 mm) herausgeschnitten und entfärbt. Die anschließende Probenvorbereitung und der tryptische Verdau wurden am DDZ in Düsseldorf durchgeführt. Die Analyse der Proteinspots erfolgte an einem MALDI-TOF/TOF MS Ultraflex I (in Zusammenarbeit mit meiner Kollegin Dr. Manuela Kratochwil) unter Anleitung von Dr. Stefan Lehr und Dr. Sonja Hartwig.

In Abbildung 5.77 ist das 2-D BN/SDS-Gel, aus dem die Spots ausgeschnitten wurden, dargestellt. Für eine bessere Zuordnung der identifizierten Untereinheiten zu den jeweiligen Proteinkomplexen wurde ein Coomassie-gefärbter BN-Gelstreifen horizontal über das Silbergefärbte SDS-Gel gelegt. Die Farbcodierung der Proteinspots stellt sich wie folgt dar:

Identifizierte Untereinheiten der **mitochondrialen ATP-Synthase (Komplex V)** sind in **Blau**, der **Chloroplasten-ATP-Synthase** in **Hellgrün**, des **Photosystems I und II** in **Dunkelgrün**, der **Ribulose-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (Rubisco)** in **Orange** und Proteine der **Transportproteine** in **Türkis** dargestellt.

Für die Zuordnung der Peptide wurde die Mascot Datenbank verwendet, die Suchparameter sind in Abschnitt 4.10.1 gezeigt. Für die Mitochondrien aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurde in der Taxonomie Plants gesucht. Ein Ergebnis der MS-Messung wird dann als signifikant bezeichnet, wenn der Mascot Score größer als 58 ($p < 0,05$) ist. Die Daten aus den MS/MS-Messungen werden unabhängig von ihrem Score dargestellt.

In den folgenden Tabellen bezeichnet die Abkürzung ID die Spotnummer des identifizierten Peptids auf dem 2-D BN/SDS-Gel. Die Abkürzung P steht für die Anzahl der Peptide und SC für die Übereinstimmung der Peptidsequenz mit der in Mascot hinterlegten Daten in %. Bei dem Begriff "Accession" handelt es sich um die Abkürzungen der identifizierten Untereinheiten entsprechend der UniProt Datenbank. Es wird auch angegeben, mit welchem Organismus die gefundene Peptidsequenz übereinstimmt. Hauptsächlich stammen die hier

identifizierten Untereinheiten und Proteine aus der Datenbank für *Chlamydomonas reinhardtii* (CHLRE). Es treten vereinzelt auch Übereinstimmungen mit folgenden Organismen auf: Weinreben (VITSX, *Vitis* sp.), Mais (MAIZE, *Zea mays*), Schmucklilien (AGAAF, *Agapanthus africanus*), Keulenfrüchte (CORLA, *Corynocarpus laevigatus*) und die Grünalgen *Scenedesmus obliquus* (SCEOB), *Oltmannsiellopsis viridis* (OLTVI) und *Nephroselmis olivacea* (NEPOL).

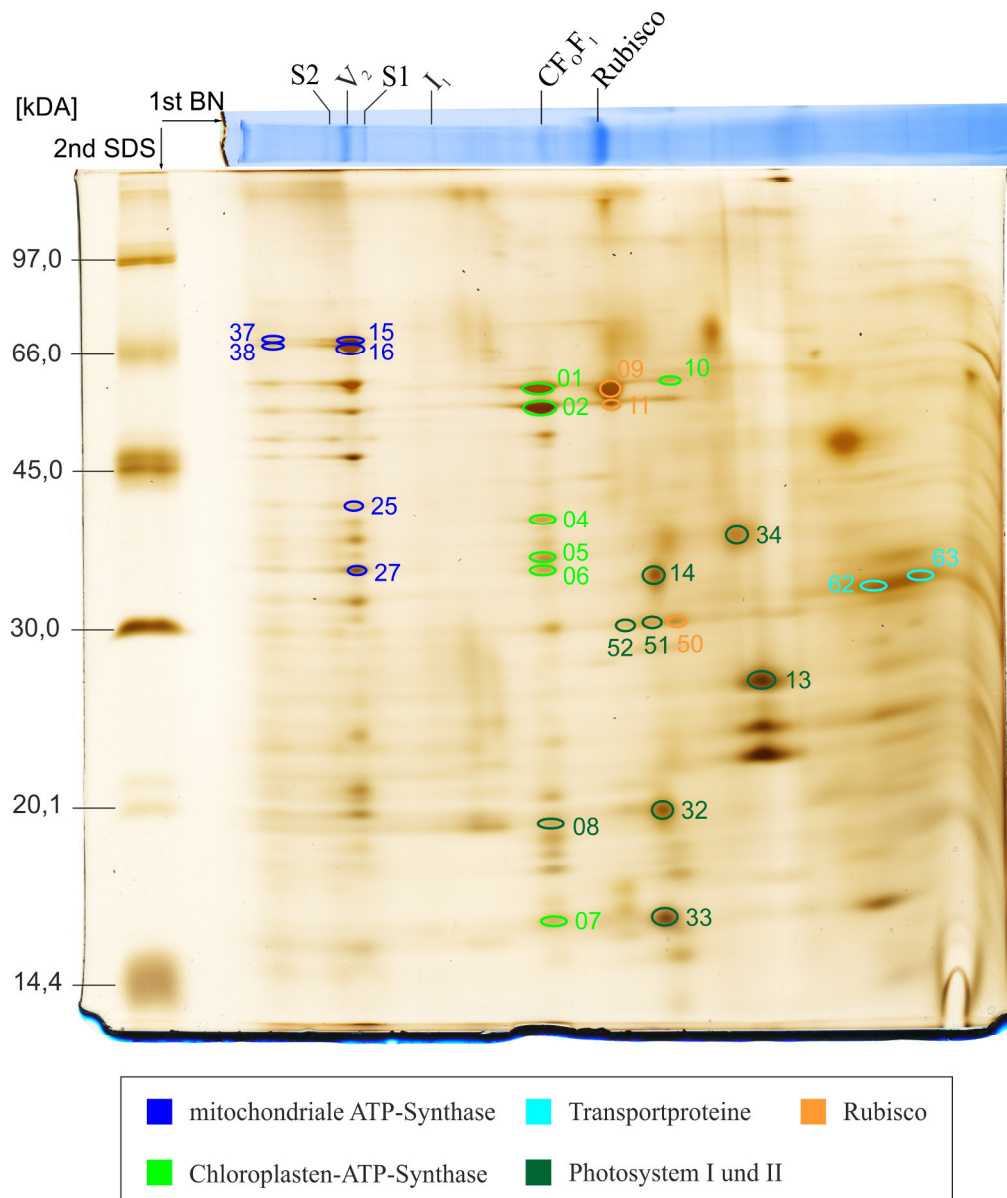


Abbildung 5.77: 2-D BN/SDS-Gel von M1P₂₂ für PMF-Analyse. Es wurden 140 µg Protein (vor Solub., bezogen auf die Chlorophyll-Konzentration, Digitonin/Chlorophyll-Verhältnis von 40 g/g) von M1P₂₂ mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Nach beendeter Elektrophorese wurde mit Silber gefärbt (Abschnitt 4.7.2). Die Färbung des Gels und das Ausschneiden der Proteinspots wurde an der TU Darmstadt durchgeführt, die Identifizierung der Spots im DDZ in Düsseldorf unter Anleitung von Dr. Stefan Lehr und Dr. Sonja Hartwig. Ein Coomassie-gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links). Identifizierte Proteinspots sind entsprechend der Einteilung unterhalb des Gels farbig dargestellt.

Bei einer nativen Elektrophorese der OxPhos-Komplexe von *C. reinhardtii* liegt die mitochondriale ATP-Synthase hauptsächlich als Dimer vor^[222]. Im Gegensatz zu Komplex V aus Herzmitochondrien von Säugetieren zeichnen sich diese Dimere durch eine etwas höhere apparente Masse von 1750 kDa (Vgl. BHM: 1500 kDa) und eine größere Stabilität aus^[57, 83]. Des Weiteren zeigen die Untereinheiten α und β des hydrophilen Kopfteils in dem SDS-Gel (2. Dim.) ein anderes elektrophoretisches Laufverhalten. Obwohl beide Untereinheiten laut UniProt Datenbank eine ähnliche Masse von ca. 62 kDa besitzen, ist der Proteinspot für die Untereinheit β in einem Bereich von 66 kDa zu finden (Spotnummer 15, 16) und die Untereinheit α liegt darunter bei ca. 60 kDa. Ähnliche Beobachtungen treten auch bei Rexroth *et al.*^[83] und Schwassmann *et al.*^[84, 85] auf. Wie in Abbildung 5.77 gezeigt, konnte die Untereinheit β auch im höher molekularen Bereich (bezogen auf das BN-Gel erste Dimension) nachgewiesen werden (Spotnummer 37, 38). Es könnte sich hierbei um ein höheres Oligomer, z.B. Tetramer, handeln. In Tabelle 5.17 sind die identifizierten Proteinspots von Komplex V aufgeführt.

Tabelle 5.17: identifizierte Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase (Komplex V); *C. reinhardtii*

ID	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
15	MS/MS	ATPBM_VITSX	ATP synthase subunit beta	Fragment (6,4)	80,1	1	33,9
16	MS/MS	ATPBM_VITSX		Fragment (6,4)	88,5	1	33,9
25	MS	ATPBM_VITSX		Fragment (6,4)	92,1	1	33,9
	MS	ATPBM_CHLRE		61,8	88,8	14	32,8
27	MS	ATPBM_CHLRE		61,8	64,6	11	30,5
37	MS	ATPBM_CHLRE		61,8	110,4	2	4,2
38	MS/MS	ATPBM_CHLRE		61,8	98,4	17	39,5

Die ADP/ATP-Translokase, auch ADP/ATP carrier protein genannt, katalysiert den Austausch von ADP und ATP über die mitochondriale innere Membran^[195, 196]. Bei diesem Transportprotein handelt es sich um ein konserviertes Protein, dass in vielen Organismen nachgewiesen werden konnte. Bei Rinderherzmitochondrien ist dieses Protein aus 297 Aminosäuren aufgebaut^[235]. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Transportproteins in Herz- und Muskelgewebe von Mensch und Rind haben gezeigt, dass mehr als 90 % übereinstimmen^[236]. Untersuchungen deuten darauf hin, dass die ADP/ATP-Translokase zusammen mit der mitochondrialen ATP-Synthase und dem Phosphat-Transporter an der Ausbildung von Superkomplex ähnlichen Strukturen, den ATP-Synthasomen, beteiligt sind^[197, 198]. Identifizierte Proteine sind in Tabelle 5.18 gelistet.

Tabelle 5.18: identifizierte Transportproteine; *C. reinhardtii*

ID	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
62	MS	ADT_CHLRE	ADP ATP carrier protein	33,5	84,9	14	42,5
	MS	ADT_CHLRE		33,5	80,1	1	3,9
63	MS	ADT_CHLRE	ADP ATP carrier protein	33,5	62,0	12	28,9
	MS/MS	ADT2_MAIZE	ADP ATP carrier protein 2	42,3	82,9	14	27,4

Ebenso wie in Mitochondrien wird auch in Chloroplasten die energiereiche Verbindung ATP synthetisiert. Im Rahmen der Photosynthese werden Protonen über die Membran transportiert und so ein elektrochemischer Protonengradient erzeugt, der von der Chloroplasten-ATP-Synthase genutzt wird, um die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat zu katalysieren. Dieser Enzymkomplex besitzt eine ähnliche räumliche Struktur wie sein mitochondriales Pendant, einen hydrophilen Kopf-Teil (F_1) und einem membranintegralen Teil (F_0), die über einen integralen und einen peripheren Stiel miteinander verbunden sind. Der Aufbau der Chloroplasten-ATP-Synthase gestaltet sich wie folgt^[36, 126]. Der F_1 -Teil ist ähnlich der mitochondrialen ATP-Synthase aus den Untereinheiten α , β , γ , δ und ϵ im Verhältnis 3:3:1:1:1 aufgebaut, allerdings ist die räumliche Anordnung dieser Untereinheiten unterschiedlich. Ebenso variiert die Bezeichnung der Untereinheiten des peripheren Stiels und der membranintegralen Teils. Der F_0 -Teil ist aus einem c-Zylinder (14 Kopien der Untereinheit c in gefunden in *Spinacia oleracea*^[50]) und der Untereinheit a aufgebaut. Der periphere Stiel besteht aus den Untereinheiten b und b'.

Es konnten die Untereinheiten α (ATPA), β (ATPB), γ (ATPG) und b (ATPF) für das Monomer der Chloroplasten-ATP-Synthase nachgewiesen werden (Tabelle 5.19).

Tabelle 5.19: identifizierte Untereinheiten der Chloroplasten-ATP-Synthase; *C. reinhardtii*

ID	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
01	MS	ATPA_CHLRE	ATP synthase subunit alpha	54,7	198,8	3	9,8
	MS	ATPA_CHLRE		54,7	177,0	20	39,6
02	MS	ATPB_SCEOB	ATP synthase subunit beta	51,7	136,1	1	2,9
	MS	ATPB_CHLRE		52,0	118,0	17	41,8
	MS/MS	ATPB_CHLRE		52,0	205,0	28	55,3
04	MS	ATPA_CHLRE	ATP synthase subunit alpha	54,7	116,0	13	25,2
	MS	ATPA_CHLRE		54,7	105,0	16	28,0
05	MS	ATPG_CHLRE	ATP synthase gamma chain	38,7	143,0	19	53,9
	MS	ATPG_CHLRE		38,7	100,1	1	3,6
06	MS	ATPB_CHLRE	ATP synthase subunit beta	52,0	176,0	24	45,5
	MS	ATPB_CHLRE		52,0	93,2	1	2,7
	MS/MS	ATPB_AGAFF		53,6	69,1	9	19,9
07	MS	ATPF_CHLRE	ATP synthase subunit b	20,1	159,3	2	14,9
10	MS	ATPA_CHLRE	ATP synthase subunit alpha	54,7	111,0	13	28,9
	MS	ATPA_OLTVI		54,0	88,8	1	2,6

Die Ribulose-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase, auch Rubisco genannt, kommt ausschließlich in Organismen vor, die Photosynthese betreiben, und ist das am häufigsten vorkommende wasserlösliche Protein auf unserem Planeten^[237, 238]. Es fixiert das Kohlenstoffdioxid aus der Atmosphäre, indem es die Addition eines Moleküls CO₂ an Ribulose-1,5-bisphosphat katalysiert. Das dabei gebildete instabile Intermediat zerfällt in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat, die in der Gluconeogenese zum Aufbau von Glucose verwendet werden.

Eine Kristallstruktur von Rubisco, isoliert aus Blättern des Virginischen Tabaks *Nicotiana tabacum*, wurde von Curmi *et al.*^[239] veröffentlicht. Jeweils vier Dimere der großen Untereinheit (L₂) und vier Dimere der kleinen Untereinheit (S₂) bilden ein Hexadekamer L₈S₈. Die kleine Untereinheit (21 kDa) besteht nur aus einer Domäne, die große Untereinheit (52 kDa) setzt sich aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne, die ein $\alpha\beta$ -barrel-Strukturmotiv besitzt^[240], zusammen. Das aktive Zentrum der Carboxylase befindet sich zwischen diesem Strukturmotiv und der N-terminalen Domäne eines Dimers^[239]. Der vollständige Enzymkomplex besitzt eine Masse von 540 kDa.

Tabelle 5.20: identifizierte Untereinheiten von Rubisco; *C. reinhardtii*

ID	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
09	MS	RBL_CHLRE	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	52,5	101,0	17	32,6
	MS	RBL_CHLRE		52,5	85,4	15	28,8
11	MS/MS	RBL_HELAN		53,8	85,1	2	4,5
52	MS/MS	RBL_CORLA		Fragment (50,4)	60,7	11	27,2
50	MS	RBS1_CHLRE	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1	20,6	103,0	14	54,6
50	MS	RBS2_CHLRE	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 2	20,6	89,8	14	51,9

Bei den Photosystemen I und II handelt es sich um Multienzymkomplexe, die in der Thylakoidmembran von Chloroplasten und Cyanobakterien vorkommen. Im Rahmen der Photosynthese sind sie für die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie in Form von Reduktionsequivalenten verantwortlich^[21, 241]. Photosystem II katalysiert den lichtgetriebenen Transfer ($\lambda < 680$ nm) von Elektronen aus Wasser auf das Akzeptormolekül Plastochinon^[242]. Während dieses Vorgangs werden 4 Protonen im Thylakoidlumen freigesetzt. Das Cytochrom *bf* katalysiert den Transfer der Elektronen von Plastochinol, der reduzierten Form von Plastichinon, auf das Plastocyanin. Währenddessen werden ebenfalls Protonen in das Thylakoidlumen transportiert. Der dadurch aufgebaute elektrochemische Protonengradient wird zur Synthese von ATP durch die ATP-Synthase genutzt.

In einer zweiten lichtgetriebenen Reaktion ($\lambda < 700$ nm) werden die Elektronen im Photosystem I von Plastochinon auf Ferredoxin übertragen. Anschließend katalysiert die Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase die Synthese von NADPH, das als Reduktionsequivalent zum Aufbau von organischer Verbindungen aus CO₂ und Wasser verwendet wird.

Tabelle 5.21: identifizierte Untereinheiten von Photosystem I und II; *C. reinhardtii*

ID	MS-Type	Accession	Protein	MW [kDa]	Mascot score	P	SC [%]
08	MS/MS	PSAF_CHLRE	Photosystem I reaction center subunit III	24,0	79,7	1	6,6
13	MS/MS	CB2_CHLRE	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I	26,9	134,9	2	13,4
14	MS	CYF_CHLRE	Apocytochrome f	34,3	89,0	14	33,8
32	MS/MS	PSAF_CHLRE	Photosystem I reaction center subunit III	24,0	86,5	1	6,6
34	MS	CYF_CHLRE	Apocytochrome f	34,3	160,0	18	49,5
33	MS/MS	PETD_CHLRE	Cytochrome b6-f complex subunit 4	17,4	76,6	2	8,8
51	MS	PSBD_NEPOL	Photosystem II D2 protein	39,2	100,2	2	5,4
52	MS/MS	PSBD_NEPOL	Photosystem II D2 protein	39,2	73,9	2	5,7

5.3 Strukturelle Untersuchungen der Chloroplasten-ATP-Synthase

5.3.1 Struktur des c_{14} -Zylinders (Kristallisation mittels Dampfdiffusionsverfahren)

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Grüber (NTU Singapur) sollte die Chloroplasten-ATP-Synthase (CF_0F_1) aus Spinat (*Spinacia oleracea*) mittels Röntgenkristallographie charakterisiert werden. Für die Isolierung der ATP-Synthase wurde nach einem modifizierten Protokoll meiner Diplomarbeit^[99] vorgegangen. Zur Stabilisierung von CF_0F_1 wurde bei dem Solubilisierungspuffer die Menge an ATP und Natriumcholat erhöht. Um Lipide und andere Membranproteine zu entfernen, erfolgte eine Fällung mit Ammoniumsulfat und anschließend eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Da die mit ATP-Synthase angereicherten Fraktionen noch Rubisco enthielten, wurde eine Farbstoff-Liganden-Chromatographie mit Reaktiv-Rot 120^[243] durchgeführt. Mittels BN-PAGE konnte gezeigt werden, dass die ATP-Synthase nach der Isolierung intakt war. Es konnten zwar geringe Menge an ungebundenem hydrophilen Kopfteils CF_1 , allerdings nicht der membranintegrale Teil CF_0 auf dem BN-Gel beobachtet werden. Des Weiteren wurden auf einem SDS-Gel alle Untereinheiten von CF_0F_1 nachgewiesen.

Um zu überprüfen, ob die ATP-Synthase noch enzymatisch aktiv war, wurde die ATP-Syntheserate mit Hilfe des Luciferin-Luciferase-Systems gemessen^[53, 227]. Die Luciferase katalysiert die Reaktion von Luciferin mit dem frisch gebildeten ATP. Das dabei gebildete Produkt reagiert mit dem Luftsauerstoff zu dem elektronisch angeregten Oxyluciferin weiter, welches ein Photon $\lambda = 560$ nm emittiert, welches mittels eines Luminometers als Chemolumineszenz gemessen wird. Zuerst musste die ATP-Synthase in Lipidvesikel rekonstituiert werden. Nachdem die Substrate zugegeben wurden und ein elektrochemischer Gradient ($\Delta\Psi + \Delta pH$) über die Membran eingestellt worden war, konnte die Menge an gebildetem ATP über die Chemolumineszenz gemessen werden. Für die zur Kristallisation verwendeten Proben wurde eine Syntheserate von 41 ± 4 ATP pro CF_0F_1 pro Sekunde ermittelt. Im Vergleich mit den in der Literatur^[243] gefundenen Daten handelt es sich hierbei um einen sehr guten Wert.

Die Kristallisationsexperimente wurden von Dr. Asha Manikoth Balakrishna durchgeführt. Dazu wurde das Verfahren der Dampfdiffusion verwendet: Aus einem Tropfen mit dem Protein und einem Präzipitationsreagenz wird über die Dampfphase Wasser entfernt, so dass sich die Konzentration an Protein im Tropfen erhöht und es kristallisiert. Die erhaltenen Kristalle wurden an einem Synchrotron (Swiss Light Source) am Paul-Scherer-Institut (Schweiz) analysiert. Bis auf den c -Zylinder gingen alle anderen Untereinheiten während der Kristallisation verloren. Die ermittelte Kristallstruktur besaß eine Auflösung von 4,50 Å. Wie auch bei Seelert *et al.*^[50] konnte bestätigt werden, dass bei der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat der c -Zylinder aus 14 c -Untereinheiten aufgebaut ist. Die Länge dieses Oligomers beträgt 60,32 Å und der äußere Ring besitzt einen Durchmesser von 52,30 Å. Weitere Angaben finden sich in^[53].



Crystallographic structure of the turbine C-ring from spinach chloroplast F-ATP synthase

Asha Manikoth BALAKRISHNA*, Holger SEELERT†¹, Sven-Hendric MARX†, Norbert A. DENCHER† and Gerhard GRÜBER*²

*Nanyang Technological University, School of Biological Sciences, 60 Nanyang Drive, Singapore 637551, Republic of Singapore

†Physikalische Biochemie, Fachbereich Chemie, Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Str.4, D-64287 Darmstadt, Germany

Synopsis

In eukaryotic and prokaryotic cells, F-ATP synthases provide energy through the synthesis of ATP. The chloroplast F-ATP synthase (CF₁F₀-ATP synthase) of plants is integrated into the thylakoid membrane via its F₀-domain subunits *a*, *b*, *b'* and *c*. Subunit *c* with a stoichiometry of 14 and subunit *a* form the gate for H⁺-pumping, enabling the coupling of electrochemical energy with ATP synthesis in the F₁ sector.

Here we report the crystallization and structure determination of the c14-ring of subunit *c* of the CF₁F₀-ATP synthase from spinach chloroplasts. The crystals belonged to space group C2, with unit-cell parameters *a* = 144.420, *b* = 99.295, *c* = 123.51 Å, and β = 104.34° and diffracted to 4.5 Å resolution. Each c-ring contains 14 monomers in the asymmetric unit. The length of the c-ring is 60.32 Å, with an outer ring diameter 52.30 Å and an inner ring width of 40 Å.

Key words: CF₁F₀-ATP synthase, c-rotor, crystallization, F-ATP synthase, spinach chloroplast.

Cite this article as: Balakrishna, A.M., Seelert, H., Marx, S.-H., Dencher, N.A. and Grüber, G. (2014) Crystallographic structure of the turbine C-ring from spinach chloroplast F-ATP synthase. Biosci. Rep. 34(2), art:e00102.doi:10.1042/BSR20130114

INTRODUCTION

The F₁F₀-ATP synthase is a membrane-bound multisubunit complex consisting of two rotary motors in the F₀ and F₁ sectors, respectively. The membrane-bound proton translocating ATP synthase of chloroplasts, CF₁F₀ catalyses ATP synthesis and ATP hydrolysis coupled to proton translocation across the F₀ sector. The chloroplast F₁ domain consists of the subunits $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ [1] and the membrane-integrated CF₀, is made up of the subunits *a*, *b*, *b'* and *c*-ring rotor subunits, which are often named subunit IV, I, II and III, respectively [2,3]. The subcomplex $\alpha_3\beta_3$ forms a hexamer with a central cavity that allows for the penetration of the γ rotor shaft [4]. Subunits γ and ϵ form the soluble part of the rotor shaft, called the central stalk [5]. Rotation of the central stalk subunit γ within the $\alpha_3\beta_3$ cavity causes conformational changes in the three catalytic sites located at the α - β interfaces leading to ATP synthesis [6]. The two parts of ATP synthases are connected by two stalks, i.e. one central rotating shaft formed by the subunits γ and ϵ and a thin stalk at the periphery, composed of

the subunits *b*, *b'* and δ holding together the F₁- and F₀ portions [5].

Subunits *a* and *c* are involved in the process of proton-pumping, thereby coupling the events of ATP synthesis and -hydrolysis in the $\alpha_3\beta_3$ -hexamer of F₁. A total of ten copies of subunit *c* in yeast F-ATP synthase are found to associate into a ring structure that interacts with the foot of the central stalk subunits in the intact enzyme [7]. The copy number of *c* subunits in the ring has been experimentally studied in different organisms and is found to vary from 8 to 15 among bacterial, yeast, plant and mammalian ATP synthases [2,7–14].

The number of subunits and therefore the diameter of the proton turbine seem to be species dependent [7,8]. Atomic Force Microscopy studies, done by Seelert et al. [2] showed that the protein turbine in F₀ of chloroplast ATP synthase has an asymmetric cylindrical structure with 14 symmetrically distributed subunits, which protrude from both membrane surfaces. Here a new protocol has been developed to obtain crystals of the c-ring of the spinach chloroplast F-ATP synthase, starting from the intact and active enzyme, which diffracted X-rays to 4.5 Å resolution.

Abbreviations: BN, blue native; CCP4, Collaborative Computational Project No. 4; DCCD, dicyclohexylcarbodiimide; DDM, *n*-dodecyl- β -D-maltoside; PDB, Protein Data Bank; SLS, Swiss Light Source; TM, transmembrane.

¹ Present address: Pharmbiotec GmbH, Biotech Processes & Analytics, Universität des Saarlandes, D-66123 Saarbrücken, Germany.

² To whom correspondence should be addressed (email ggrueber@ntu.edu.sg).



The crystallographic structure shows that each of the fourteen *c* subunits folds into a hairpin of two TM (transmembrane) helices, connected by a short partially structured loop. The presented *c*14-ring structure is discussed from the perspective of bioenergetic costs in plants.

EXPERIMENTAL

Isolation of enzymatically active chloroplast F-ATP synthase

Chloroplast ATP synthase was isolated from spinach (*Spinacea oleracea* L.) following the procedure described by Pick and Racker [15] with slight modifications as described in [16]. Thylakoid membranes were solubilized using the detergents sodium cholate (23 mM) and octyl- β -D-glucopyranoside (40 mM). For removal of contaminating proteins and lipids, the ATP synthase was subjected to fractionated ammonium sulfate precipitation and sucrose density gradient centrifugation (containing 1 mg/ml aolectin and 8 mM DDM (*n*-dodecyl- β -D-maltoside), to stabilize the protein). Thereafter, the enzyme was purified by dye-ligand chromatography with reactive red 120 [16].

Electrophoresis

BN (blue-native)-PAGE was performed using a Hoefer Mighty Small II SE 250 system (small gel: 10 cm \times 8 cm \times 0.15 cm) as described [17,18]. The stacking gel had an acrylamide concentration of 3% and the separating gel an acrylamide gradient from 3.5 to 16%. Approximately 30 μ g of solubilized purified CF₁F₀-ATP synthase in DDM was loaded per lane. A high molecular weight native marker (GE Healthcare) served as mass standard.

After electrophoresis the gel was scanned to document the bands stained by BN-PAGE. Subsequently, ATPase activity of the CF₁F₀-ATP synthase was determined by incubating the gel in buffer A1 containing 35 mM Tris, 270 mM glycine, 14 mM MgSO₄, 0.2% (w/v) Pb(NO₃)₂, 8 mM ATP, pH 7.8 at 37 °C for several hours [19,20]. The white lead phosphate precipitate was documented with a CCD-Imaging System (LAS 3000 intelligent dark box, Fujifilm).

SDS-PAGE was performed according to Laemmli [21], with a stacking gel of 3% and separating gel of 14%. In order to maintain integrity of the subunit *c* oligomer, protein samples were incubated at room temperature (25 °C) in SDS loading buffer for 10 min. For visualization of protein bands, the gel was stained with Coomassie R-250.

Measurement of ATP synthesis

To measure the ATP synthesis activity driven by an electrochemical proton gradient, reconstitution of solubilized ATP synthase into liposomes (phosphatidyl choline/phosphatidic acid, 9:1, w/w) was performed as previously described [20]. As a reference, CF₁F₀-ATP synthase was inhibited by adding DCCD (di-

cyclohexylcarbodiimid, 50 μ M) before reconstitution into liposomes and incubation for 30 min at room temperature [22].

ATP synthesis activity of the CF₁F₀-ATP synthase was measured according to Fischer et al. [23] and Poetsch et al. [24] with slight modifications. 240 μ l buffer L2 (200 mM Tricin, 5 mM sodium dihydrogenphosphate, 2.5 mM MgCl₂, 120 mM KCl, 0.2 mM ADP, pH 8.3) was added into a clinicon-cuvette and mixed with 12.5 μ l Luciferin-Luciferase-reagent (ATP-Monitoring Kit; Thermo Labsystems). The cuvette was placed into a Luminometer (BioOrbit 1250) and the baseline was recorded.

Approximately 43 μ l of proteoliposomes were equilibrated with 217 μ l buffer L1 (20 mM sodium succinate, 5 mM sodium dihydrogenphosphate, 2.5 mM MgCl₂, 0.6 mM KCl, 1 μ M Valinomycin, pH 4.7). After 100 s, the mixture was injected via a cannula into the cuvette containing L2. ATP synthesis, driven by the established TM electrochemical gradient (Δ pH and Δ K⁺), was monitored as luminescence applying the Luciferin-Luciferase-Assay. For calibrating the luminescence signal, 20 μ l of 10 μ M ATP was added.

Crystallization trials of CF₁F₀-ATP synthase from spinach chloroplast

Initial screens of the entire CF₁F₀-ATP synthase at a concentration of 18 mg/ml were set up using the Memplus screen from Molecular Dimensions, UK, using the vapour diffusion method. In several drops, phase separation was observed and systematic variations of pH, precipitant and protein concentration were done to promote nucleation. Crystals grew out of the phase and took approximately 2 months to appear under optimized conditions and cryo freezed in 50% (v/v) mineral oil and paratone. Crystals were analysed at the Swiss Light Source and diffracted to 4.5 Å.

Data collection

A single wavelength dataset of the CF₁F₀ crystal was collected at the protein crystallography beamline S06 PX at the SLS (Swiss Light Source) with a PILATUS 6M detector. Data were collected as a series of 0.2° oscillation images with 10 s exposure time and a detector distance of 500 mm. All diffraction data were indexed, integrated using the iMosflm program [25] and reduced with SCALA [26] and CTRUNCATE [27]. The results of data processing and data statistics are summarized in Table 1.

Structure solution and refinement

The structure of the *c*-rotor of CF₁F₀-ATP synthase was determined by molecular replacement using the coordinates of the *c*-rotor of the proton-translocating chloroplast ATP synthase [12] [PDB (Protein Data Bank) code 2W5J]. Only the main chain atoms of the model were used for structure solution. Molecular replacement was performed using the PHASER program (TFZ = 11.7, LLG score = 963, [28]). Since anisotropy was observed in the data, they were subjected to ellipsoidal truncation and anisotropic scaling using the program SCALEIT, which is

Table 1 Data collection

Values in parentheses are for the highest resolution shell (6.32–6.0 Å).

Statistics of crystallographic**data collection**

Wavelength (Å)	1.00
Space group	C2
Unit cell	$a = 144.420$, $b = 99.295$, $c = 123.51$ Å
	$\beta = 104.34^\circ$
Resolution range (Å)	30–6.0 (6.32–6.0)
No. of unique reflections	4238
Total no. of reflections	12041
Multiplicity	2.8 (2.8)
Completeness (%)	97.6 (98.37)
I/ σ	9.6 (5.3)
R_{merge}^*	0.049 (0.106)
Mosaicity	0.82

* $R_{\text{merge}} = \sum \sum_i |I_i - \langle I_i \rangle| / \sum \sum_i I_i$, where I_i is the mean intensity for reflection h .

integrated in CCP4 (Collaborative Computational Project No. 4) [29]. Diffraction anisotropy was evidenced as a directional dependence in diffraction quality. The crystal diffracted to 4.5 Å in the horizontal direction and to 6.0 Å in the vertical direction. This kind of anisotropy is attributed to whole-body anisotropic vibration of unit cells, resulting in the crystal packing interactions being more uniform in one direction than in the other. Therefore, the R-factors were stalled at one stage during refinement and hence the data resolution was truncated at 6.0 Å. The model was manually corrected in COOT [30] and refined in REFMAC [31]. Many cycles of model building and restrained refinement with tight geometric restraints were carried using overall temperature factor and NCS (non-crystallographic symmetry) restraints. Density modification was carried out by DM in the CCP4 suite. ProSMART (Procrustes Structural Matching Alignment and Restraint Tool) was used for generation of external restraints for the refinement [32]. The PDB ID 2W5J was used as reference for exercising this restraint. In the final REFMAC cycles, TLS (translation, libration, screw) procedure was applied. The structure was validated using PROCHECK [33]. All the figures were drawn using PYMOL [34]. Structural comparison analysis are carried out using the SUPERPOSE program [35]. The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the PDB (ID: 4MJN).

RESULTS AND DISCUSSION

Biochemical characterization of the entire CF₁F₀-ATP synthase

The complete chloroplast F₁F₀-ATP synthase from spinach, used for crystallization, was characterized by different methods. The

enzyme showed high purity as revealed by SDS-PAGE (Figure 1A) and BN-PAGE (1B). In the SDS gel, the bands of all subunits were present and subunit c (III) migrated as an intact oligomer (Figure 1B). Besides purity, the BN gel demonstrated the presence of predominantly intact CF₁F₀-ATP synthase (mass of > 500 kDa in Figure 1B). Only a small proportion of unbound CF₁ is present, but no CF₀. These indicate that the crystallized c14-cylinder emerged from the intact enzyme. Additionally, the in-gel assay of ATP hydrolysis demonstrates the preservation of the enzymatic activity of the isolated ATP synthase preparation (results not shown). Since ATP hydrolysis in intact chloroplast ATP synthases is strictly regulated by the subunits ϵ and γ and other effectors [20], this activity assay can only provide a first indication of functional integrity. Therefore ATP synthesis activity of the CF₁F₀-ATP synthase was examined (Figure 1C). This was achieved by reconstitution of the entire CF₁F₀-ATP synthase into liposomes and application of an electrochemical proton gradient. With this method, an ATP synthesis activity of 41 ± 4 ATP per enzyme per second was determined.

Crystallization and preliminary X-ray analysis

The enzymatically active and entire CF₁F₀-ATP synthase was used for crystallization and crystals of good diffraction quality appeared from the optimized phase separated drop under conditions of 33 % (v/v) PEG 550 MME, 0.05 M sodium acetate pH 4.3 (Figure 1D). The crystals were colourless, in contrast to recently obtained yellow crystals, which were described to contain one chlorophyll and two carotenoids [3]. However, no protein structure from this crystal form has yet been described [3].

The crystals obtained diffracted to 4.5 Å resolution and belonged to C2 space group ($\beta = 104.34^\circ$), with unit-cell parameters $a = 144.42$, $b = 99.29$, and $c = 123.51$ Å. The phases were obtained using the crystal structure of the c14 rotor ring of the chloroplast F-ATP synthase (PDB ID 2W5J [12]. The solvent content was calculated to be 63.45 % and V_m was 3.36 Å^3 per Da [36].

Analysis of the data as well as the solution from molecular replacement confirmed that only the c-ring rotor of the chloroplast ATP synthase is present in the crystal structure, whereas all the F₁ subunits α , β , γ , δ and ϵ and subunits a , b and b' of the membrane-integral F₀ domain are lost during the crystallization process. The initial electron density map also suggests that most probably only the c-ring is present in the crystal structure.

Overall structure of the c-rotor

The structure of the c-rotor of the spinach chloroplast F-ATP synthase was determined by the molecular replacement method and refined to 6.0 Å. A summary of the refinement statistics is given in Table 2. Analysis of the stereochemical quality of the final model by PROCHECK has identified that 97 % of all the residues are within the core regions of the Ramachandran plot, 2.1 % are within the allowed regions, and 0.9 % are within the generously allowed region. No residues are present in the disallowed region. The last four C-terminal amino acids are not visible in the electron

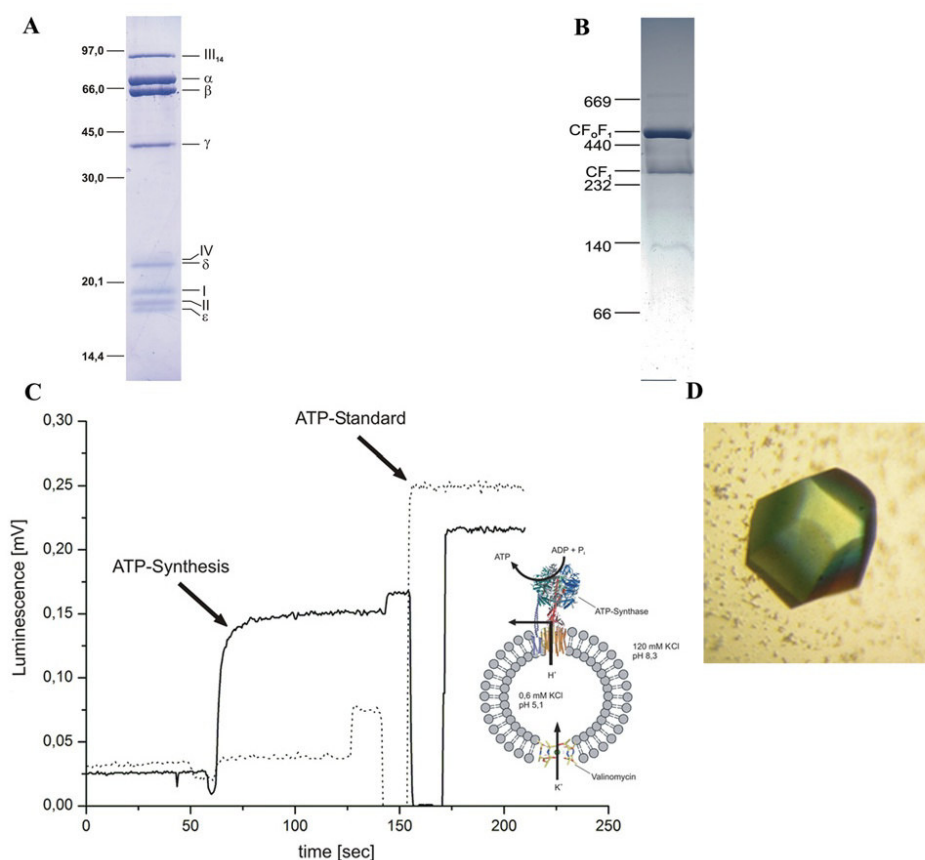


Figure 1 Biochemical and functional characterization of the purified chloroplast F-ATP synthase (A) SDS gel (14 % total acrylamide and 4 % cross-linked acrylamide) of the purified CF₁F₀-ATP synthase from spinach chloroplasts. The gel reveals the F₁ subunits α₃β₃γδ_ε and the CF₀ subunits b, b', c and a, respectively, which are also called I, II, III and IV in plants. Subunit c (III) migrates as a 14-protomer entity. (B) BN gel Coomassie Brilliant Blue stained of 30 μg CF₁F₀-ATP synthase isolated from spinach chloroplasts. (C) ATP synthesis activity of CF₁F₀-ATP synthase of *Spinacea oleracea*. The graph demonstrates the generation of ATP induced by an electrochemical H⁺/K⁺ gradient. To demonstrate that ATP is only produced by the ATP-synthase, the measurements were also performed with CF₁F₀-ATP synthase inhibited by DCCD treatment before reconstitution (dotted line). (D) Crystal of the c-ring from spinach chloroplast CF₁F₀-ATP synthase.

density map. Validation with ERRAT server gave an overall quality factor of 97.03 % [37]. The rmsd (root-mean-square distance) between the presented structure and the previously determined c-ring of the chloroplast ATP synthase (2W5J [12]) is 1.509 Å. The overall structure of the spinach chloroplast c-ring is shown in Figures 2(A) and 2(B). Each subunit c folds into a hairpin of two TM helices, connected by a short partially structured loop (Figure 2E). The individual hairpin, composed of an N-terminal TM and a C-terminal TM, produce an inner- and an outer ring.

The N-terminal helices face the inner side of the ring, whereas the C-terminal helices face the outside of the loop. This arrangement facilitates interaction of the conserved glutamic acid residues of subunit c (Figure 3) with the conserved Arginine residue from subunit a, providing the structural requirements to form a part of the proton channel in the F₀ domain. Figures 2(C) and 2(D) display the electrostatic charge surface of this rotary entity. The cytoplasmic and the luminal surfaces of the c ring are very polar in nature as they are in contact with the aqueous phase. The

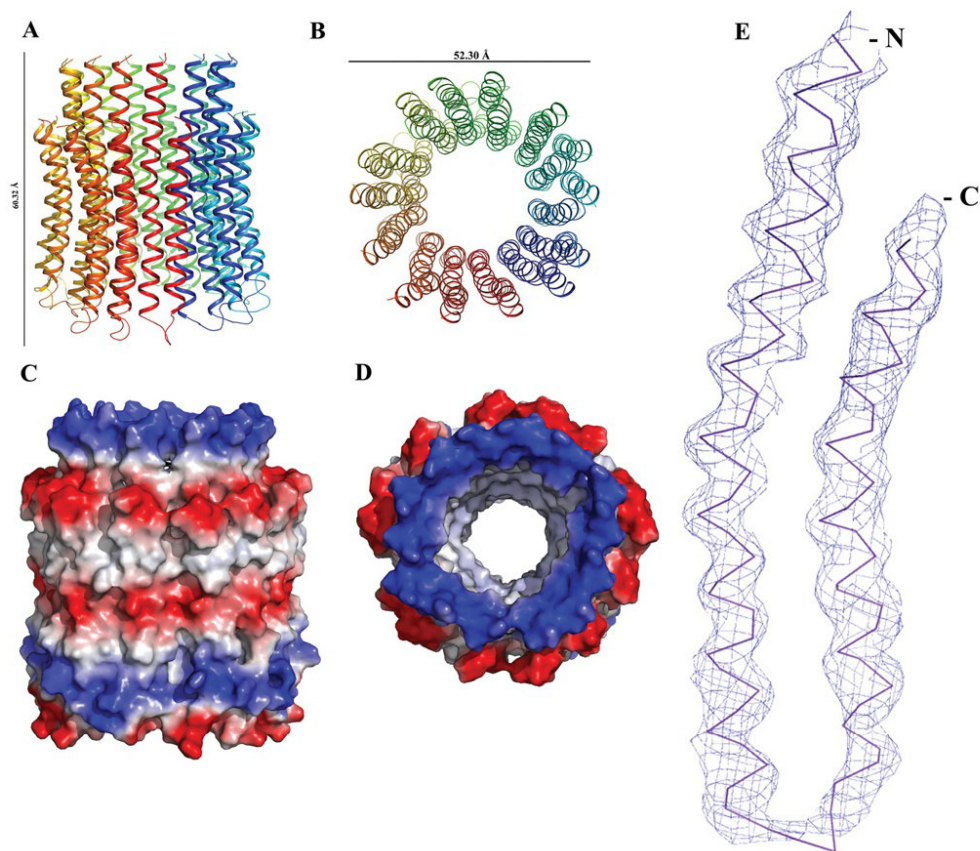


Figure 2 The structure of the c-ring of the spinach chloroplast F-ATP synthase

(A) Cartoon representation of the c-ring in side view and (B) view from the lumen. (C) The electrostatic potential (calculated in pymol [34]) mapped on the surface of the c-ring with positive areas in blue, negative in red, and neutral in white colour, in side view. (D) The electrostatic potential mapped on the surface of the c-ring, the view is from the lumen. (E) Electron density map ($2F_o - F_c$) of chain A at 1σ for the c-ring.

hydrophilic patch at the centre of the membrane region represents the proton-binding site.

The length of the spinach chloroplast c-ring assembly is 60.32 Å long. The outer ring diameter is 52.3 Å, and the inner ring has a width of 40 Å. The inner space would be wide enough to accommodate detergent molecules. Interestingly, electron density could be observed in the initial maps in this region. However, this cannot be confirmed at this moderate resolution. Previously studies of 2D crystals of the intact CF_0 or $c_{14}a$ complex by AFM and Cryo-electron microscopy revealed distinct mass/electron density inside and protruding from the c14-cylinder. The isolated

c14-cylinder, however, was 'empty' [41,42]. The electron density for the hairpin was continuous. Because of the achieved resolution, only the density for the main chains could be identified (Figure 2E).

The crystal lattice reveals one c-ring consisting of 14 monomers (c14 ring) in the asymmetric unit forming crystal contacts with three neighbouring rings. The $\kappa = 180^\circ$ section of the self-rotation function, calculated for the crystal form using MOLREP (Collaborative Computational Project No. 4) with an integration radius of 20.0 Å and data in the resolution range 15–6 Å, showed a string of 14 peaks. The loop region of one ring

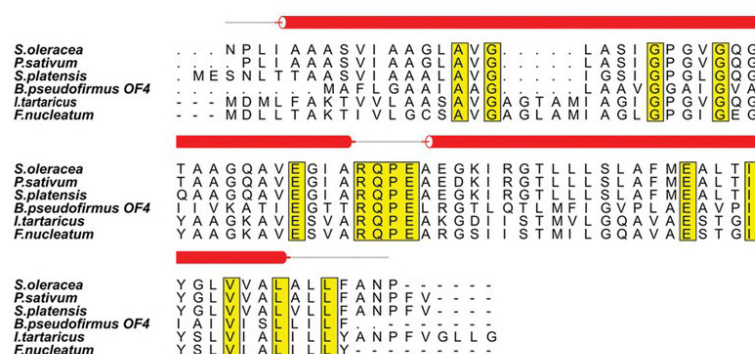


Figure 3 Multiple sequence alignment of *c* subunits of F-ATP synthases from *Spinacia oleracea*, *Pisum sativum*, *Spirulina platensis*, *Bacillus pseudofirmus* OF4, *Ilyobacter tartaricus* and *Fusobacterium nucleatum*

All the conserved residues are highlighted in yellow. The sequence of Spinach chloroplast *c* subunit along with its secondary structure was generated to related homologous structures. The secondary structures are drawn in red. The figure was generated using ALSCRIPT.

Table 2 Refinement statistics

Refinement statistics	
*R factor(%)	35.3
†R free(%)	37.8
Ramachandran statistics	
Most favored (%)	97
Additionally allowed (%)	2.1
Generously (%)	0.9
Disallowed (%)	0.0
R.M.S. deviations	
Bond lengths (Å)	0.019
Bond angles (°)	2.019
Mean atomic B values (Å ²)	
Overall	39.72

*R-factor = $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, where F_o and F_c are measured and calculated structure factors, respectively.
†Rfree = $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, calculated from 5% of the reflections selected randomly and omitted from the refinement process.

is in close contact with the loop region of its symmetry mate. The other two points of contact in the crystal lattice involves the monomers in the N-terminal region.

Comparison with c-rotors of other organisms

Crystallographic structures of the *c*-ring rotors have been reported for F-ATP synthases from *Ilyobacter tartaricus* [9], *Spirulina platensis* [13], *Pisum sativum* [38] and *Saccharomyces cerevisiae* [7,10]. Among all the *c*-ring structures, only the spinach and pea chloroplasts are related by tetradecameric symmetry in the asymmetric unit. Despite this similarity, the two display markedly different shapes, with the *c*-ring of *P. sativum* taking up a concave

barrel shape with a pronounced waist in the middle, whereas that of spinach chloroplast has a much less pronounced concave curvature.

The diameters of these *c*-ring rotors differ from organism to organism, because of the variation in the number of protomers. The undecameric *c*-ring of *I. tartaricus* shows a cylindrical, hour-glass shaped protein complex with an outer diameter of ~50 Å and inner diameter of ~17 Å [9]. The pea chloroplast *c*-ring has an outer ring diameter of 60.5 Å and an inner ring diameter of 35 Å [38]. The *c*15 ring from *S. platensis* has an hour glass shaped assembly with an outer diameter of 65 Å and an inner diameter of 54 Å [13]. The yeast *c*-ring diameter in the F_1c_{10} complex structure is ~55 Å and the inner diameter is ~27 Å and comprises ten protomers [7]. In comparison, the spinach chloroplast *c*14 ring presented here has an external diameter of 52.30 Å, whereas that of the inner ring is 40 Å. From the perspective of bioenergetic costs 14 protons have to be translocated across the thylakoid membrane per full rotation of the rotary *c*-ring, whereby each rotation of 360° produces three molecules of ATP in the $\alpha_3\beta_3$ -headpiece of F_1 . Therefore 3.7 protons are needed to synthesize one molecule of ATP in the spinach chloroplast F-ATP synthase. In comparison, 2.7 protons per ATP are required for the bovine mitochondrial F-ATP synthase, whose *c*-ring consists of eight *c* subunits [8], reflecting a more efficient enzyme with respect to protons consumed per ATP generated, at least at first glance. However, the two components of the proton-motive force, i.e. the membrane potential and the pH gradient, are kinetically not equivalent and different sizes of the cation-powered rotors may be nature's solution to cope with the challenges of diverse environments [42].

Recently, two more *c*-ring crystal structures have been solved, one from *Fusobacterium nucleatum*, which has 11 protomers [39], and the other from *Bacillus pseudofirmus* OF4, which has 13 protomers [40]. These studies demonstrated that the alanine

motif in the c13-ring from *B. pseudofirmus* OF4 contributes to high complex stability, with A-to-G mutations reducing the c-ring stoichiometry, in this case from c13 to c12, whereas G-to-A mutations increases it. From the sequence alignment in Figure 3, it can be seen that the c11-ring of *I. tartaricus* consists of 17.8% alanine residues compared with an alanine content of 21.8% in the c14-ring of the spinach chloroplast F₁-ATP synthase investigated here.

There is urgent need to determine the structure of the intact CF₀ turbine, in order to elucidate the spatial arrangement of the subunits *b* and *b'*, and especially of subunit *a* in relation to the c14-ring. This would also lead to an answer to the pertinent question of how the c-ring is made proton-tight so as to prevent harmful proton leaks across its central structure, that would otherwise bypass the specific proton pathway between subunit *a* and the c subunits.

AUTHOR CONTRIBUTION

Asha Manikoth Balakrishna did the crystallization, data analysis and solved the structure and the refinement. Sven-Hendric Marx purified the protein. Holger Seeler and Norbert A. Dencher contributed to the experimental design of assays and discussions. Gerhard Grüber designed the studies and experiments and supervised the research. All authors participated in writing the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors sincerely thank Dr Kamariah Neelagandan (School of Biological Sciences, NTU) and the staff at the protein crystallography beamline S06 PX at the Swiss Light Source (SLS) for expert help with data collection. We also thank Professor M. Featherstone (SBS, NTU) for reading the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Ministry of Education (MOE), Singapore [grant number MOE2011-T2-2-156; ARC 18/12; to G.G.].

REFERENCES

- Boekema, E. J., van Heel, M. and Gräber, P. (1998) Structure of chloroplast F₁ ATPase studied by electron microscopy and image processing. *Biochim. Biophys. Acta* **933**, 365–371.
- Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H. and Müller, D. J. (2000) Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* **405**, 418–419.
- Varco-Merth, B., Fromme, R., Wang, M. and Fromme, P. (2008) Crystallization of the c14-rotor of the chloroplast ATP synthase reveals that it contains pigments. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 605–612.
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. and Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8-Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart-mitochondria. *Nature* **370**, 621–628.
- Junge, W., Lill, H. and Engelbrecht, S. (1997) ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *TIBS* **22**, 420–423.
- Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. and Walker, J. E. (2000) The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055–1061.
- Stock, D., Leslie, A. G. W. and Walker, J. E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700–1705.
- Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G. W. and Walker, J. E. (2010) Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 16823–16827.
- Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W. and Dimroth, P. (2005) Structure of the rotor ring of F₁-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science* **308**, 659–662.
- Symersky, J., Pagadala, V., Osowski, D., Krah, K., Meier, T., Faraldo-Gómez, J. D. and Mueller, D. M. (2012) Structure of the c(10) ring of the yeast mitochondrial ATP synthase in the open conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 485–491.
- Matthies, D., Preiss, L., Klyszejko, A. L., Müller, D. J., Cook, G. M., Vonck, J. and Meier, T. (2009) The c13 ring from a thermoalkaliphilic ATP synthase reveals an extended diameter due to a special structural region. *J. Mol. Biol.* **388**, 611–618.
- Vollmar, M., Schlieper, D., Winn, M., Buchner, C. and Groth, G. (2009) Structure of the c14 rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **284**, 18228–18235.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* **53**, 240–255.
- Pogoryelov, D., Krah, A., Langer, J. D., Yildiz, O., Faraldo-Gómez, J. D. and Meier, T. (2010) Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the F₀ complex of ATP synthases. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 891–899.
- Pick, U. and Racker, E. (1979) Purification and reconstitution of the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase complex from spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **254**, 2793–2799.
- Seelert, H., Poetsch, A., Rohlf, M. and Dencher, N. A. (2000) Dye-ligand chromatographic purification of intact multisubunit membrane protein complexes: application to the chloroplast H⁺-F₀F₁-ATP synthase. *Biochem. J.* **346**, 41–44.
- Neff, D. and Dencher, N. A. (1999) Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast F₀F₁-ATP synthase, CF₀ and CF₁ by blue native electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 569–575.
- Krause, F. and Seelert, H. (2008) Detection and analysis of protein-protein interactions of organellar and prokaryotic proteomes by blue native and colorless native gel electrophoresis. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **51**, 14.11.1–14.11.36.
- Zerbetto, E., Vergani, L. and Dabbeni-Sala, F. (2000) Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **18**, 2059–2064.
- Suhai, T., Heidrich, N. G., Dencher, N. A. and Seelert, H. (2009) Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels. *Electrophoresis* **30**, 3622–3625.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680–685.
- Suhai, T., Dencher, N. A., Poetsch, A. and Seelert, H. (2008) Remarkable stability of the proton translocating F₁F₀-ATP synthase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1131–1140.
- Fischer, S., Etzold, C., Turina, P., Deckers-Hebestreit, G., Altendorf, K. and Gräber, P. (1994) ATP synthesis catalyzed by the ATP synthase of *Escherichia coli* reconstituted into liposomes. *Eur. J. Biochem.* **225**, 167–172.
- Poetsch, A., Rexroth, S., Heberle, J., Link, T., Dencher, N. A. and Seelert, H. (2003) Characterisation of subunit III and its oligomer from spinach chloroplast ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1618**, 59–66.



- 25 Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. and Leslie, A. G. W. (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. D* **67**, 271–281
- 26 Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D* **62**, 72–82
- 27 French, G. and Wilson, K. (1978) On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallogr. A* **34**, 517–525
- 28 McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674
- 29 Dyda, F. (2010) Developments in low-resolution biological X-ray crystallography. *Biol. Rep.* **2**, 80–82
- 30 Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) COOT: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **60**, 2126–2132
- 31 Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* **53**, 240–255
- 32 Nicholls, R. A., Long, F. and Murshudov, G. N. (2012) Low-resolution refinement tools in REFMAC5. *Acta Crystallogr. D* **68**, 404–417
- 33 Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291
- 34 DeLano, W. L. (2002) The PyMol molecular graphics system. DeLano Scientific, USA
- 35 Krissinel, E. and Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr. D* **60**, 2256–2268
- 36 Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497
- 37 Colovos, C. and Yeates, T. O. (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* **2**, 1511–1519
- 38 Saroussi, S., Schushan, M., Ben-Tal, N., Junge, W. and Nelson, N. (2012) Structure and flexibility of the c-ring in the electromotor of rotary F₀F₁-ATPase of pea chloroplasts. *PLoS ONE* **7**, e43045
- 39 Schulz, S., Iglesias-Cans, M., Krah, A., Yildiz, O., Leone, V., Matthies, D., Cook, G. M., Faraldo-Gómez, J. D. and Meier, T. (2013) A new type of Na⁺-driven ATP synthase membrane rotor with a two-carboxylate ion-coupling motif. *PLoS Biol.* **6**, e1001596
- 40 Preiss, L., Klyszejko, A. L., Hicks, D. B., Liu, J., Fackelmayer, O. J., Yildiz, Ö., Krulwich, T. A. and Meier, T. (2013) The c-ring stoichiometry of ATP synthase is adapted to cell physiological requirements of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 7874–7879
- 41 Seelert, H., Dencher, N. A. and Müller, D. J. (2003) Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor of spinach chloroplast ATP-synthase. *J. Mol. Biol.* **333**, 337–344
- 42 Seelert, H., Dani, D. N., Dante, S., Hauß, T., Krause, F., Schäfer, E., Frenzel, M., Poetsch, A., Rexroth, S., Schwaßmann, H. J. et al. (2009) From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-converting membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 657–671

Received 7 November 2013/9 January 2014; accepted 13 January 2014

Published as Immediate Publication 13 February 2014, doi 10.1042/BSR20130114

5.3.2 Membranproteinkristallisation: "Breaking the detergent paradigm"

Membranproteine besitzen innerhalb der Zelle viele verschiedene Aufgaben und sind ein Hauptangriffspunkt für viele Medikamente. Um ein Verständnis über die molekularen Vorgänge und die Wirkung von Medikamenten zu erlangen, sind daher genaue Informationen über die drei-dimensionale Struktur und die Aminosäure-Wechselwirkungen innerhalb des Enzyms notwendig. Bedingt durch die amphiphile Natur dieser Enzymklasse müssen Membranproteine erst aus der Membran mit einem Detergens herausgelöst (solubilisiert) und in Lösung stabilisiert werden. Da diese Detergenzien allerdings nur teilweise die lipophile Umgebung nachahmen können, ist die Auswahl des richtigen Detergens entscheidend für die Solubilisierung und Kristallisation eines intakten Enzyms. Im Rahmen dieser Veröffentlichung wird ein neues Konzept vorgestellt, um dieses Problem zu umgehen. Für die Kristallisation von Membranproteinen aus unterschiedlichen amphiphilen Umgebungen (Membranen, Polymere, Nanodiscs, Detergenzien) werden kubische Lipid-Phasen (LCP) eingesetzt. Es hat sich gezeigt, dass die Dicke der hydrophoben Schichten innerhalb dieser kubischen Phasen ein entscheidender Parameter für die erfolgreiche Kristallisation darstellen. So konnten Kristalle von Proteinen erhalten werden, bei denen konventionelle LCP-Protokolle fehlschlagen.

In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Gordeliy (IBS Grenoble; ICS Jülich; MIPT Moskau) sollte mit dieser neuen Methode die Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat (*Spinacia oleracea*) kristallisiert und mittels Röntgenkristallographie strukturell charakterisiert werden. Die Isolierung der ATP-Synthase erfolgte nach dem in der Veröffentlichung^[53] dargestellten Protokoll. Dementsprechend konnte mittels BN-PAGE gezeigt werden, dass die isolierte ATP-Synthase intakt war. Die ATP-Syntheserate wurde mit dem Luciferin-Luciferase-ATP-Test ermittelt und lag für alle zur Verfügung gestellten Proben in einem Bereich von 36 ± 5 ATP pro CF_0F_1 pro Sekunde. Ähnlich dem Dampfdiffusionsverfahren^[53] gingen bei dieser Methode bis auf den c_{14} -Zylinder alle anderen Untereinheiten während des Kristallisationsprozesses verloren. In Abbildung 5.78 ist die Kristallstruktur des c_{14} -Zylinders der Chloroplasten-ATP-Synthase mit einer Auflösung von 2,48 Å dargestellt. Die Kristallpackung ist senkrecht (a, b) und parallel (c) zur Membranebene gezeigt. Eine seitliche drei-dimensionale Darstellung des c_{14} -Zylinders ist in Abbildung 5.78 d zu finden.

Das Manuskript wurde bei Nature Chemical Biology (Impact Factor 5.6) zur Veröffentlichung eingereicht.

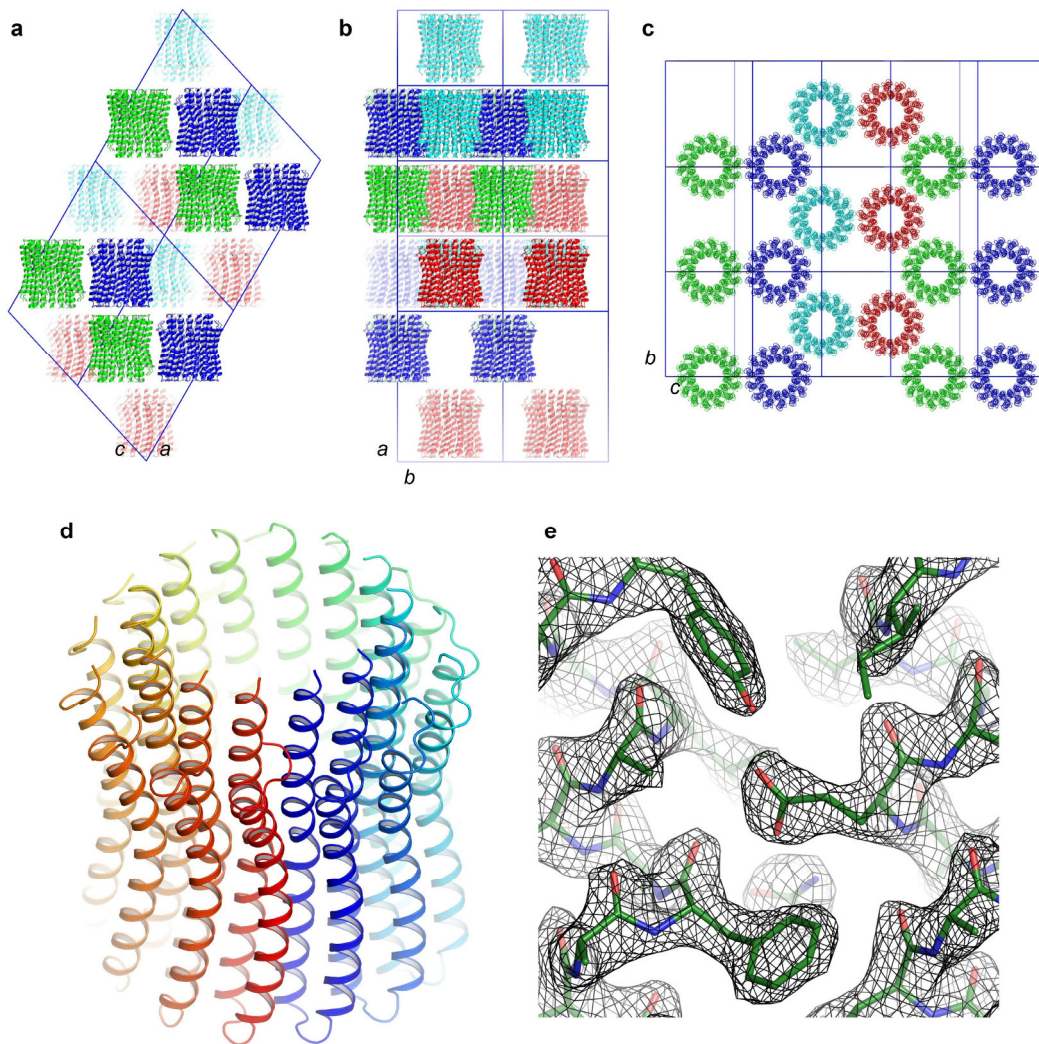


Abbildung 5.78: Kristallstruktur des c_{14} -Zylinders der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat (*Spinacia oleracea*) mit einer Auflösung von 2,48 Å. Die Kristallpackung des c-Zylinders senkrecht (**a** und **b**) und parallel (**c**) zur Membranebene. Seitliche dreidimensionale Ansicht des c-Zylinders (**d**). Beispiel einer Elektronendichteverteilung, die gezeigte $2F_o-F_c$ -Karte mit den aufgelösten Aminosäureseitenketten ist konturiert mit der Einstellung 1,5 σ (**e**).

Membrane protein crystallization: breaking the detergent paradigm

Ekaterina Round^{a,b,c,d,1}, Valentin Borshchevskiy^{d,e,1}, Vitaly Polovinkin^{a,b,c}, Vitaly Shevchenko^d,
Alina Remeeva^{d,2}, Ivan Gushchin^{a,b,c,d}, Andrii Ishchenko^{d,f,3}, Alexander Kuklin^{e,g}, Sven-Hendric Marx^h,
Norbert A. Dencher^h, Georg Büldt^e, Valentin Gordeliy^{a,b,c,d,e,4}

Key words: membrane proteins, detergents, solubilization, crystallization, amphiphilic bilayer, X-ray crystallography

^aUniv. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France

^bCNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France

^cCEA, IBS, F-38044 Grenoble, France

^dInstitute of Complex Systems (ICS), ICS-5: Molecular Biophysics, Research Centre Juelich, 52425 Juelich, Germany

^eLaboratory for advanced studies of membrane proteins, Moscow Institute of Physics and Technology, 141700 Dolgoprudniy, Russia

^fInstitute of Crystallography, University of Aachen (RWTH), Jaegerstrasse 17-19, 52056 Aachen, Germany

^gThe Frank Laboratory of Neutron Physics, Joint Institute of Nuclear Research (JINR), Joliot-Curie str. 6, 141980 Dubna, Russia

^hPhysical Biochemistry, Department of Chemistry, Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Str. 4, D-64287 Darmstadt, Germany

¹*These authors contributed equally to this work*

²Current affiliation: Laboratorium Structurele Neurobiologie, O&N I Herestraat 49 bus 601, 3000 Leuven, Belgium

³Current affiliation: The Bridge@USC, Department of Chemistry, Dornsife College of Letters, Arts and Sciences, University of Southern California

⁴Author for correspondence: valentin.gordeliy@ibs.fr



6 Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
(w/v)	Gewicht pro Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µL	Mikroliter
1-D	erste Dimension
2-D	zweite Dimension
4-IPBA	Iodophenylborsäure
AcOH	Essigsäure
ADP	Adenosindiphosphat
AgNO ₃	Silbernitrat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHM	Rinderherzmitochondrien
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BN	Blau nativ
BSA	Albumin Fraktion V
C	Vernetzungsgrad
cm	Zentimeter
CaCl ₂	Calciumchlorid
CN	farblos nativ
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoCl ₂	Cobaltchlorid
CuSO ₄	Kupfersulfat
DAB	Diaminobenzidin
DDM	Dodecylmaltosid
DDZ	Deutsches Diabetes Zentrum
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
DHM	Rehherzmitochondrien
DKM	Rehnieremitochondrien
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FeSO ₄	Eisensulfat
g	Erdschwerebeschleunigung (1 g = 9,81 m·s ⁻²)
g	Gramm
h	Stunden
H ₀	Nullhypothese
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
H ₃ BO ₃	Borsäure
HCl	Salzsäure

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMW	HMW Native Marker Kit
IBS	Institut de Biologie Structurale (Grenoble)
ICS	Institute of Complex Systems (Grenoble)
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KCL	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
LMW	LMW-SDS Marker Kit
M	Molar
mA	Miliampere
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magensiumchlorid
MgSO ₄	Magensiumsulfat
MHM	Mäuseherzmitochondrien
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MnCl ₂	Manganchlorid
MS	Massenspektrometrie
N ₂	flüssiger Stickstoff
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ MoO ₄	Natriummolydat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
Na ₃ PO ₄	Natriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Nitrocellulose
NBT	Nitrotetrazoliumblau
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	Ammoniumheptamolybdat
nm	Nanometer
OG	Octylglycosid
OxPhos	oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrlamidgelelektrophorese
Pb(NO ₃) ₂	Bleinitrat
PHM	Schweineherzmitochondrien
PIC_M	Protease-Inhibitor-Cocktail for Mammals
PIC_P	Protease-Inhibitor-Cocktail for Plants
PBS	Pierce® <i>Protein-free</i> T20 Blocking Buffer
R _F HM	Rattenherzmitochondrien (Fischer)

R _w HM	Rattenherzmitochondrien (Wistar)
RPM	Rotationen pro Minute
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SC	Superkomplexe
SDS	Natriumdodecylsulfat
stat. sig.	statistisch signifikant
stat. n. sig.	statistisch nicht signifikant
T	Totalacrylamidkonzentration
TEMED	Tetramethylethan-1,2-diamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WHM	Wildschweinherzmitochondrien
V	Volt
V	absoluter Graustufenwert
V %	relativer Graustufenwert
vs.	versus
λ	Wellenlänge

7 Literaturverzeichnis

- [1] Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N. H., Krause, F., Dencher, N. A., and Vonck, J. (2006), "Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes". *J Biol Chem* **281**: 15370-15375.
- [2] Schäfer, E., Dencher, N. A., Vonck, J., and Parcej, D. N. (2007), "Three-Dimensional Structure of the Respiratory Chain Supercomplex I1III2IV1 from Bovine Heart Mitochondria". *Biochemistry* **46**: 12579-12585.
- [3] Kratochwil, M. (2015), "Effects of ageing, calorie restriction and ageing-associated diseases on the mitochondrial proteome". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [4] Hunzinger, C., Wozny, W., Schwall, G. P., Poznanovic, S., Stegmann, W., Zengerling, H., Schoepf, R., Groebe, K., Cahill, M. A., Osiewacz, H. D., Jagemann, N., Bloch, M., Dencher, N. A., Krause, F., and Schrattenholz, A. (2006), "Comparative profiling of the mammalian mitochondrial proteome: multiple aconitase-2 isoforms including N-formylkynurenine modifications as part of a protein biomarker signature for reactive oxidative species". *J Proteome Res* **5**: 625-633.
- [5] Reifschneider, N. H., Goto, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Sugawa, M., Dencher, N. A., and Krause, F. (2006), "Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE". *J Proteome Res* **5**: 1117-1132.
- [6] Groebe, K., Krause, F., Kunstmann, B., Unterluggauer, H., Reifschneider, N. H., Scheckhuber, C. Q., Sastri, C., Stegmann, W., Wozny, W., Schwall, G. P., Poznanovic, S., Dencher, N. A., Jansen-Durr, P., Osiewacz, H. D., and Schrattenholz, A. (2007), "Differential proteomic profiling of mitochondria from *Podospora anserina*, rat and human reveals distinct patterns of age-related oxidative changes". *Exp Gerontol* **42**: 887-898.
- [7] Kühlbrandt, W. (2015), "Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes". *BMC Biol* **13**: 89.
- [8] Meyer zu Tittingdorf, J. M. (2004), "Isolierung, Charakterisierung und Kristallisation der Chloroplasten-ATP-Synthase und des Subkomplex CFO". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [9] Meyer zu Tittingdorf, J. M., Rexroth, S., Schäfer, E., Schlichting, R., Giersch, C., Dencher, N. A., and Seelert, H. (2004), "The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected by the metabolic state". *Biochim Biophys Acta* **1659**: 92-99.
- [10] Hema, R., Senthil-Kumar, M., Shivakumar, S., Chandrasekhara Reddy, P., and Udayakumar, M. (2007), "*Chlamydomonas reinhardtii*, a model system for functional validation of abiotic stress responsive genes". *Planta* **226**: 655-670.
- [11] Wagner, K., Perschil, I., Fichter, C. D., and van der Laan, M. (2010), "Stepwise Assembly of Dimeric F(1)F(o)-ATP Synthase in Mitochondria Involves the Small F(o)-Subunits k and i". *Molecular Biology of the Cell* **21**: 1494-1504.
- [12] Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012), "Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling". *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 566-578.
- [13] Wang, C. and Youle, R. J. (2009), "The role of mitochondria in apoptosis*". *Annu Rev Genet* **43**: 95-118.
- [14] Bratic, A., Larsson, N.-G., xF, and ran (2013), "The role of mitochondria in aging". *The Journal of Clinical Investigation* **123**: 951-957.
- [15] Arun, S., Liu, L., and Donmez, G. (2016), "Mitochondrial Biology and Neurological Diseases". *Curr Neuroparmacol* **14**: 143-154.
- [16] Lee, J. (2016), "Mitochondrial drug targets in neurodegenerative diseases". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **26**: 714-720.
- [17] Archer, S. L. (2013), "Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases". *New England Journal of Medicine* **369**: 2236-2251.
- [18] Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007), "The machines that divide and fuse mitochondria". *Annu Rev Biochem* **76**: 751-780.

- [19] Alexandre, A., Reynafarje, B., and Lehninger, A. L. (1978), "Stoichiometry of vectorial H⁺ movements coupled to electron transport and to ATP synthesis in mitochondria". *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 5296-5300.
- [20] Swift, A. (2011), "http://41.media.tumblr.com/ed6c91b18ffb6b8af2d4effcce25bf46/tumblr_mx1jl1o7t7g1rhhb9f5o1_r1_1280.jpg". *Scientist Magazine*
- [21] Berg, J., M.; Tymoczko, J., L.; Stryer L. (2007), "Stryer Biochemie". Berlin-Heidelberg, Springer Spektrum.
- [22] Schultz, B. E. and Chan, S. I. (2001), "Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes". *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**: 23-65.
- [23] Genova, M. L. and Lenaz, G. (2014), "Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1837**: 427-443.
- [24] Vartak, R., Porras, C.-M., and Bai, Y. (2013), "Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly". *Protein & Cell* **4**: 582-590.
- [25] von Ballmoos, C., Wiedenmann, A., and Dimroth, P. (2009), "Essentials for ATP synthesis by F₁F₀ ATP synthases". *Annu Rev Biochem* **78**: 649-672.
- [26] Pozharskii, A. F. S., A.; Katritzky, A. R. (2011), "Heterocycles in Life and Society: An Introduction to Heterocyclic Chemistry, Biochemistry and Applications, 2nd Edition". Weinheim, WILEY-VCH.
- [27] Capaldi, R. A. and Aggeler, R. (2002), "Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor". *Trends Biochem Sci* **27**: 154-160.
- [28] Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2010), "Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria". *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 16823-16827.
- [29] Harris, D. A. and Das, A. M. (1991), "Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart". *Biochem J* **280 (Pt 3)**: 561-573.
- [30] Mitchell, P. (1961), "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism". *Nature* **191**: 144-148.
- [31] Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994), "Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria". *Nature* **370**: 621-628.
- [32] Böttcher, B. and Gräber, P. (2000), "The structure of the H⁺-ATP synthase from chloroplasts and its subcomplexes as revealed by electron microscopy". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1458**: 404-416.
- [33] Cingolani, G. and Duncan, T. M. (2011), "Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation". *Nat Struct Mol Biol* **18**: 701-707.
- [34] Efremov, R. G. and Sazanov, L. A. (2011), "Respiratory complex I: 'steam engine' of the cell?". *Current Opinion in Structural Biology* **21**: 532-540.
- [35] Friedrich, T. and Scheide, D. (2000), "The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases". *FEBS Lett* **479**: 1-5.
- [36] Walker, J. E. (2013), "The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown". *Biochem Soc Trans* **41**: 1-16.
- [37] Racker, E. (1963), "A mitochondrial factor conferring oligomycin sensitivity on soluble mitochondrial ATPase". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **10**: 435-439.
- [38] Walker, J. E., Runswick, M. J., and Saraste, M. (1982), "Subunit equivalence in *Escherichia coli* and bovine heart mitochondrial F₁F₀ ATPases". *FEBS Letters* **146**: 393-396.
- [39] Stock, D., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (1999), "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase". *Science* **286**: 1700-1705.
- [40] Groth, G. and Pohl, E. (2001), "The structure of the chloroplast F₁-ATPase at 3.2 Å resolution". *J Biol Chem* **276**: 1345-1252.

- [41] Hausrath, A. C., Gruber, G., Matthews, B. W., and Capaldi, R. A. (1999), "Structural features of the gamma subunit of the Escherichia coli F(1) ATPase revealed by a 4.4-Å resolution map obtained by x-ray crystallography". *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13697-13702.
- [42] Weber, J. and Senior, A. E. (2003), "ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase". *FEBS Lett* **545**: 61-70.
- [43] Ueno, H., Suzuki, T., Kinoshita, K., and Yoshida, M. (2005), "ATP-driven stepwise rotation of FoF1-ATP synthase". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 1333-1338.
- [44] Duser, M. G., Zarrabi, N., Cipriano, D. J., Ernst, S., Glick, G. D., Dunn, S. D., and Borsch, M. (2009), "36 degrees step size of proton-driven c-ring rotation in FoF1-ATP synthase". *Embo j* **28**: 2689-2696.
- [45] Junge, W. and Nelson, N. (2015), "ATP synthase". *Annu Rev Biochem* **84**: 631-657.
- [46] Boyer, P. D. (1998), "Energy, life, and ATP". *Biosci Rep* **18**: 97-117.
- [47] Nakamoto, R. K., Scanlon, J. A. B., and Al-Shawi, M. K. (2008), "The Rotary Mechanism of the ATP Synthase". *Archives of biochemistry and biophysics* **476**: 43-50.
- [48] Hinkle, P. C. (2005), "P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1706**: 1-11.
- [49] Jones, P. C. and Fillingame, R. H. (1998), "Genetic fusions of subunit c in the F0 sector of H⁺-transporting ATP synthase. Functional dimers and trimers and determination of stoichiometry by cross-linking analysis". *J Biol Chem* **273**: 29701-29705.
- [50] Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H., and Muller, D. J. (2000), "Structural biology: Proton-powered turbine of a plant motor". *Nature* **405**: 418-419.
- [51] Tomashek, J. J. and Brusilow, W. S. (2000), "Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability". *J Bioenerg Biomembr* **32**: 493-500.
- [52] Giraud, M. F., Paumard, P., Sanchez, C., Brethes, D., Velours, J., and Dautant, A. (2012), "Rotor architecture in the yeast and bovine F1-c-ring complexes of F-ATP synthase". *J Struct Biol* **177**: 490-497.
- [53] Balakrishna, A. M., Seelert, H., Marx, S. H., Dencher, N. A., and Gruber, G. (2014), "Crystallographic structure of the turbine c-ring from spinach chloroplast F-ATP synthase". *Biosci Rep*.
- [54] Pogoryelov, D., Yildiz, O., Faraldo-Gomez, J. D., and Meier, T. (2009), "High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase". *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1068-1073.
- [55] Hackenbrock, C. R., Chazotte, B., and Gupta, S. S. (1986), "The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport". *J Bioenerg Biomembr* **18**: 331-368.
- [56] Allen, R. D., Schroeder, C. C., and Fok, A. K. (1989), "An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques". *J Cell Biol* **108**: 2233-2240.
- [57] van Lis, R., Atteia, A., Mendoza-Hernandez, G., and Gonzalez-Halphen, D. (2003), "Identification of novel mitochondrial protein components of Chlamydomonas reinhardtii. A proteomic approach". *Plant Physiol* **132**: 318-330.
- [58] Dudkina, N. V., Sunderhaus, S., Braun, H.-P., and Boekema, E. J. (2006), "Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from Saccharomyces and Polytomella mitochondria". *FEBS Letters* **580**: 3427-3432.
- [59] Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A., and Schagger, H. (1998), "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits". *Embo j* **17**: 7170-7178.
- [60] Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Br  thes, D., di Rago, J.-P., and Velours, J. (2002), "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology". *The EMBO Journal* **21**: 221-230.
- [61] Marques, I., Dencher, N. A., Videira, A., and Krause, F. (2007), "Supramolecular organization of the respiratory chain in Neurospora crassa mitochondria". *Eukaryot Cell* **6**: 2391-2405.

- [62] Krause, F., Scheckhuber, C. Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N. H., Dencher, N. A., and Osiewacz, H. D. (2006), "OXPHOS Supercomplexes: respiration and life-span control in the aging model *Podospira anserina*". *Ann N Y Acad Sci* **1067**: 106-115.
- [63] Schagger, H. and Pfeiffer, K. (2000), "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria". *Embo Journal* **19**: 1777-1783.
- [64] Krause, F., Reifschneider, N. H., Goto, S., and Dencher, N. A. (2005), "Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria". *Biochem Biophys Res Commun* **329**: 583-590.
- [65] Eubel, H., Jansch, L. Braun, H.-P. (2003), "New Insights into the Respiratory Chain of Plant Mitochondria. Supercomplexes and a Unique Composition of Complex II". *Plant Physiology* **133**: 274-286.
- [66] Giraud, M. F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brethes, D., di Rago, J. P., and Velours, J. (2002), "Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae?". *Biochim Biophys Acta* **1555**: 174-180.
- [67] Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M. F., Dautant, A., Brethes, D., and Velours, J. (2004), "The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology". *J Biol Chem* **279**: 40392-40399.
- [68] Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Korner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W., Cyrklaff, M., Neupert, W., and Reichert, A. S. (2009), "Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcjl and Su e/g". *J Cell Biol* **185**: 1047-1063.
- [69] Bornhovd, C., Vogel, F., Neupert, W., and Reichert, A. S. (2006), "Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes". *J Biol Chem* **281**: 13990-13998.
- [70] Wittig, I. and Schagger, H. (2008), "Structural organization of mitochondrial ATP synthase". *Biochim Biophys Acta* **1777**: 592-598.
- [71] Fronzes, R., Weimann, T., Vaillier, J., Velours, J., and Brethes, D. (2006), "The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits". *Biochemistry* **45**: 6715-6723.
- [72] Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., Rycovska, A., Zickermann, V., and Kühlbrandt, W. (2011), "Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria". *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 14121-14126.
- [73] Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gomez, J. D., and Kühlbrandt, W. (2012), "Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae". *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 13602-13607.
- [74] García, J. J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernández, P., and Rodríguez-Zavala, J. S. (2006), "The Inhibitor Protein (IF1) Promotes Dimerization of the Mitochondrial F1F0-ATP Synthase[†]". *Biochemistry* **45**: 12695-12703.
- [75] Campanella, M., Parker, N., Tan, C. H., Hall, A. M., and Duchon, M. R. (2009), "IF(1): setting the pace of the F(1)F(o)-ATP synthase". *Trends Biochem Sci* **34**: 343-350.
- [76] Couoh-Cardel, S. J., Uribe-Carvajal, S., Wilkens, S., and Garcia-Trejo, J. J. (2010), "Structure of dimeric F1F0-ATP synthase". *J Biol Chem* **285**: 36447-36455.
- [77] Vazquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C., and Gonzalez-Halphen, D. (2006), "The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex". *J Bioenerg Biomembr* **38**: 271-282.
- [78] Colina-Tenorio, L., Miranda-Astudillo, H., Cano-Estrada, A., Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Remacle, C., and González-Halphen, D. (2016), "Subunit Asa1 spans all the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophycean alga *Polytomella* sp". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1857**: 359-369.

- [79] Villavicencio-Queijeiro, A., Vazquez-Acevedo, M., Cano-Estrada, A., Zarco-Zavala, M., Tuena de Gomez, M., Mignaco, J. A., Freire, M. M., Scofano, H. M., Foguel, D., Cardol, P., Remacle, C., and Gonzalez-Halphen, D. (2009), "The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric". *J Bioenerg Biomembr* **41**: 1-13.
- [80] Strauss, M., Hofhaus, G., Schroder, R. R., and Kühlbrandt, W. (2008), "Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane". *Embo j* **27**: 1154-1160.
- [81] Garcia-Trejo, J. J. and Morales-Rios, E. (2008), "Regulation of the F1F0-ATP synthase rotary nanomotor in its monomeric-bacterial and dimeric-mitochondrial forms". *J Biol Phys* **34**: 197-212.
- [82] Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., and García, J. J. (2005), "Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F(0) bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 12356-12358.
- [83] Rexroth, S., Meyer zu Tittingdorf, J. M., Schwassmann, H. J., Krause, F., Seelert, H., and Dencher, N. A. (2004), "Dimeric H⁺-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Biochim Biophys Acta* **1658**: 202-211.
- [84] Schwassmann, H. J., Rexroth, S., Seelert, H., and Dencher, N. A. (2007), "Metabolism controls dimerization of the chloroplast FoF1 ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*". *FEBS Lett* **581**: 1391-1396.
- [85] Schwassmann, H. J. (2010), "Analyse von Atmungskettenkomplexen aus Organellen von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Rattus norvegicus*". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [86] Schägger, H., Cramer, W. A., and von Jagow, G. (1994), "Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis". *Analytical Biochemistry* **217**: 220-230.
- [87] Wittig, I. and Schägger, H. (2005), "Advantages and limitations of clear-native PAGE". *Proteomics* **5**: 4338-4346.
- [88] Krause, F. (2004), "Biochemische Charakterisierung der supramolekularen Organisation der mitochondrialen OXPHOS-Komplexe von Säugern, Pilzen und Pflanzen". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [89] Ankudin, O. (2015), "Untersuchung der tierischen mitochondrialen Atmungskette und der Chloroplasten-ATP-Synthase". Masterarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [90] Petermann, V. (2015), "Analyse von Atmungskettenkomplexen und Membranen von Säugetiermitochondrien sowie der Lipidperoxidation". Masterarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [91] Höhner, R., Barth, J., Magneschi, L., Jaeger, D., Niehues, A., Bald, T., Grossman, A., Fufezan, C., Hippler, M. (2013), "The Metabolic Status Drives Acclimation of Iron Deficiency Responses in *Chlamydomonas reinhardtii* as Revealed by Proteomics Based Hierarchical Clustering and Reverse Genetics". *Molecular & Cellular Proteomics* **12**: 2774-2790.
- [92] Harris, E. H. (2009), "The *Chlamydomonas* sourcebook - Introduction to *Chlamydomonas* and Its Laboratory Use". Bd. 1, Academic Press, 2. Aufl.
- [93] Smith, A. L. (1967), "Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria: Slaughterhouse material, small-scale". *Methods in Enzymology* **10**: 81-86.
- [94] Reifschneider, N. H. (2006), "Elektrophoretische und massenspektrometrische Analyse des mitochondrialen Proteoms von Eukaryonten". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [95] Thilmany, S. C. (2013), "Das mitochondriale Proteom von *Rattus norvegicus* in Abhängigkeit von Alter und Kalorienrestriktion". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [96] Rexroth, S., Meyer zu Tittingdorf, J. M., Krause, F., Dencher, N. A., and Seelert, H. (2003), "Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome". *Electrophoresis* **24**: 2814-2823.
- [97] Eriksson, M., Gardestrom, P., Samuelsson, G. (1995), "Isolation, Purification, and Characterization of Mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*". *Plant Physiology* **107**: 479-483.

- [98] Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989), "Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **975**: 384-394.
- [99] Marx, S. H. (2011), "Isolierung, Charakterisierung und Quantifizierung von ATP-Synthase und anderen Membranproteinen". Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [100] Bradford, M. M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- [101] Zor, T., Selinger, Z. (1996), "Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies". *Anal Biochem* **236**: 302-308.
- [102] Diezel, W., Kopperschlager, G., Hofmann, E. (1972), "An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue". *Anal Biochem* **48**: 617-620.
- [103] Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S., Makino, K., and Tokuda, K. (1986), "Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer". *Clin Chem* **32**: 1551-1554.
- [104] Marshall, T., Williams, K. M. (2004), "Interference in the Coomassie Brilliant Blue and Pyrogallol Red protein dye-binding assays is increased by the addition of sodium dodecyl sulfate to the dye reagents". *Analytical Biochemistry* **331**: 255-259.
- [105] Hadwiger, L. A., Schwochau, M. E. (1971), "Specificity of deoxyribonucleic Acid intercalating compounds in the control of phenylalanine ammonia lyase and pisatin levels". *Plant Physiol* **47**: 346-351.
- [106] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951), "Protein measurement with the folin phenol reagent". *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
- [107] Lottspeich, F. a. E., J. W. (2012), "Bioanalytik". Berlin-Heidelberg, Springer Spektrum.
- [108] Legler, G., Müller-Platz, C., Mentges-Hettkamp, M., Pflieger, G., Jülich, E. (1985), "On the chemical basis of the Lowry protein determination". *Analytical Biochemistry* **150**: 278-287.
- [109] Peterson, G. L. (1977), "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable". *Analytical Biochemistry* **83**: 346-356.
- [110] von Hagen, J. (2008), "Proteomics Sample Preparation". Weinheim, WILEY-VCH
- [111] Muhr, P., Likussar, W., and Schubert-Zsilavecz, M. (1996), "Structure Investigation and Proton and Carbon-13 Assignments of Digitonin and Cholesterol using Multidimensional NMR Techniques". *Magnetic Resonance in Chemistry* **34**: 137-142.
- [112] Wittig, I., Braun, H.-P., and Schägger, H. (2006), "Blue native PAGE". *Nat. Protocols* **1**: 418-428.
- [113] Reisinger, V., Eichacker, L. A. (2006), "Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE". *Proteomics* **6 Suppl 2**: 6-15.
- [114] Krause, F. and Seelert, H. (2008), "Detection and analysis of protein-protein interactions of organellar and prokaryotic proteomes by blue native and colorless native gel electrophoresis". *Curr Protoc Protein Sci Chapter 14*: Unit 14 11.
- [115] Wittig, I. and Schägger, H. (2009), "Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions". *Proteomics* **9**: 5214-5223.
- [116] Schägger, H. and von Jagow, G. (1987), "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa". *Analytical Biochemistry* **166**: 368-379.
- [117] Eubel, H., Braun, H. P., Millar, A. H. (2005), "Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions". *Plant Methods* **1**: 11.
- [118] Healthcare, G. (2015), "HMW Native Marker Kit".
- [119] Healthcare, G. (2015), "LMW-SDS Marker Kit".
- [120] Görg, A., Postel, W., and Westermeier, R. (1978), "Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane". *Analytical Biochemistry* **89**: 60-70.

- [121] Patton, W. F. (2002), "Detection technologies in proteome analysis". *Journal of Chromatography B* **771**: 3-31.
- [122] Hamdan, M. H. and Righetti, P. G. (2005), "Proteomics Today: Protein Assessment and Biomarkers Using Mass Spectrometry, 2D Electrophoresis, and Microarray Technology". Weinheim, WILEY-VCH
- [123] Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987), "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels". *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- [124] Rabilloud, T., Vuillard, L., Gilly, C., and Lawrence, J. J. (1994), "Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview". *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **40**: 57-75.
- [125] Miller, I., Crawford, J., Gianazza, E. (2006), "Protein stains for proteomic applications: which, when, why?". *Proteomics* **6**: 5385-5408.
- [126] Seelert, H. (2000), "Reinigung, Kristallisation und Strukturermittlung der CF₀F₁-ATP-Synthase aus *Spinacea oleracea* L.". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [127] Berggren, K. N., Schulenberg, B., Lopez, M. F., Steinberg, T. H., Bogdanova, A., Smejkal, G., Wang, A., and Patton, W. F. (2002), "An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation". *Proteomics* **2**: 486-498.
- [128] Molecular Probes, I. D. T. (2007), "SYPRO®Ruby Protein Gel Stain, Product Information".
- [129] Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T. H., Kemper, C., Lopez, M. F., Diwu, Z., Haugland, R. P., and Patton, W. F. (2000), "Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex". *Electrophoresis* **21**: 2509-2521.
- [130] Patton, W. F. (2000), "A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics". *Electrophoresis* **21**: 1123-1144.
- [131] Volkova, K., Kovalska, V., and Yarmoluk, S. (2007), "Modern techniques for protein detection on polyacrylamide gels: problems arising from the use of dyes of undisclosed structures for scientific purposes". *Biotechnic & Histochemistry* **82**: 201-208.
- [132] Efremov, R. G., Baradaran, R., and Sazanov, L. A. (2010), "The architecture of respiratory complex I". *Nature* **465**: 441-445.
- [133] Heidrich, N. G. (2011), "Superkomplexe aus Algen und Cyanobakterien". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [134] Grandier-Vazeille, X. and Guérin, M. (1996), "Separation by Blue Native and Colorless Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis of the Oxidative Phosphorylation Complexes of Yeast Mitochondria Solubilized by Different Detergents: Specific Staining of the Different Complexes". *Analytical Biochemistry* **242**: 248-254.
- [135] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996), "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å". *Science* **272**: 1136-1144.
- [136] Seligman, A. M., Karnovsky, M. J., Wasserkrug, H. L., and Hanker, J. S. (1968), "Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB)". *J Cell Biol* **38**: 1-14.
- [137] Wittig, I., Karas, M., and Schagger, H. (2007), "High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes". *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 1215-1225.
- [138] Suhai, T., Heidrich, N. G., Dencher, N. A., and Seelert, H. (2009), "Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels". *Electrophoresis* **30**: 3622-3625.
- [139] Decker, V. (2016), "Beeinflussung von Zellphysiologie und mitochondrialen Funktionen durch Alzheimer Demenz-assoziiertes amyloides β-Peptid". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [140] Haan, C. and Behrmann, I. (2007), "A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background". *J Immunol Methods* **318**: 11-9.
- [141] Invitrogen (2015), "MagicMark™ XP Western Protein Standard".

- [142] Beavis, R. C. and Chait, B. T. (1989), "Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins". *Rapid Commun Mass Spectrom* **3**: 432-435.
- [143] Bruker (2012), "Instruction for Use Prespotted AnchorChip PAC II 384 / 96 HCCA".
- [144] Decodon (2012), "Erste Schritte in Delta2D".
- [145] Frenzel, M. (2012), "Mitochondrial ageing in rat brain areas and human fibroblasts". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [146] Dittrich, M., Hayashi, S., and Schulten, K. (2004), "ATP hydrolysis in the betaTP and betaDP catalytic sites of F1-ATPase". *Biophys J* **87**: 2954-2967.
- [147] Koschack, J. (2008), "Standardabweichung und Standardfehler: der kleine, aber feine Unterschied". *Z Allg Med* **84**: 258-260.
- [148] Weiß, C. (2013), "Basiswissen Medizinische Statistik". Berlin-Heidelberg, Springer Spektrum.
- [149] Frenzel, M., Rommelspacher, H., Sugawa, M. D., and Dencher, N. A. (2010), "Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex". *Exp Gerontol* **45**: 563-572.
- [150] Schägger, H. (2001), "Respiratory Chain Supercomplexes". *IUBMB Life* **52**: 119-128.
- [151] Dudkina, N. V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E. J., Braun, H. P. (2005), "Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III". *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3225-3229.
- [152] Mourier, A., Matic, S., Ruzzenente, B., Larsson, N. G., and Milenkovic, D. (2014), "The respiratory chain supercomplex organization is independent of COX7a2l isoforms". *Cell Metab* **20**: 1069-1075.
- [153] Major, T., von Janowsky, B., Ruppert, T., Mogk, A., and Voos, W. (2006), "Proteomic analysis of mitochondrial protein turnover: identification of novel substrate proteins of the matrix protease pim1". *Mol Cell Biol* **26**: 762-776.
- [154] Moslemi, A. R., Darin, N., Tulinius, M., Oldfors, A., and Holme, E. (2005), "Two new mutations in the MTATP6 gene associated with Leigh syndrome". *Neuropediatrics* **36**: 314-318.
- [155] Rojo, A., Campos, Y., Sanchez, J. M., Bonaventura, I., Aguilar, M., Garcia, A., Gonzalez, L., Rey, M. J., Arenas, J., Olive, M., and Ferrer, I. (2006), "NARP-MILS syndrome caused by 8993 T>G mitochondrial DNA mutation: a clinical, genetic and neuropathological study". *Acta Neuropathol* **111**: 610-616.
- [156] Chen, X., Thorburn, D. R., Wong, L.-J., Vladutiu, G. D., Haas, R. H., Le, T., Hoppel, C., Sedensky, M., Morgan, P., and Hahn, S. H. (2011), "Quality improvement of mitochondrial respiratory chain complex enzyme assays using *Caenorhabditis elegans*". *Genet Med* **13**: 794-799.
- [157] Haseder I. E., S. G., Schneider K. (2000), "Knaurs Großes Jagdlexikon". Weltbild Verlag, München.
- [158] Wernicke, C., Hellmann, J., Zieba, B., Kuter, K., Ossowska, K., Frenzel, M., Dencher, N. A., and Rommelspacher, H. (2010), "9-Methyl-beta-carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease". *Pharmacol Rep* **62**: 35-53.
- [159] Kuter, K., Kratochwil, M., Berghauzen-Maciejewska, K., Głowacka, U., Sugawa, M. D., Ossowska, K., and Dencher, N. A. (2016), "Adaptation within mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and membrane viscosity during degeneration of dopaminergic neurons in an animal model of early Parkinson's Disease". *Biochim Biophys Acta* **1862**: 741-753.
- [160] Muschol, M. (2014), "Analyse der Enzymaktivitäten von OxPhos-Komplexen / Superkomplexen und Veränderungen des mitochondrialen Proteoms in Bezug auf Alter und Kalorienrestriktion". Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [161] Koziel, R., Pircher, H., Kratochwil, M., Lener, B., Hermann, M., Dencher, N. A., and Jansen-Durr, P. (2013), "Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4". *Biochem J* **452**: 231-239.
- [162] Phillips, D., Covian, R., Aponte, A. M., Glancy, B., Taylor, J. F., Chess, D., and Balaban, R. S. (2012), "Regulation of oxidative phosphorylation complex activity: effects of tissue-specific metabolic stress within an allometric series and acute changes in workload". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **302**: R1034-R1048.

- [163] Brindley, M. A. and Plemper, R. K. (2010), "Blue native PAGE and biomolecular complementation reveal a tetrameric or higher-order oligomer organization of the physiological measles virus attachment protein H". *J Virol* **84**: 12174-12184.
- [164] Kwong, L. K. and Sohal, R. S. (2000), "Age-Related Changes in Activities of Mitochondrial Electron Transport Complexes in Various Tissues of the Mouse". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**: 16-22.
- [165] Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J. P., Casteilla, L., Letellier, T., and Rossignol, R. (2006), "Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation". *Am J Physiol Cell Physiol* **291**: C1172-C1182.
- [166] Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M., and Munnich, A. (1994), "Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies". *Clin Chim Acta* **228**: 35-51.
- [167] Xu, F., Ackerley, C., Maj, M. C., Addis, J. B., Levandovskiy, V., Lee, J., Mackay, N., Cameron, J. M., and Robinson, B. H. (2008), "Disruption of a mitochondrial RNA-binding protein gene results in decreased cytochrome b expression and a marked reduction in ubiquinol-cytochrome c reductase activity in mouse heart mitochondria". *Biochem J* **416**: 15-26.
- [168] Li, Y., D'Aurelio, M., Deng, J.-H., Park, J.-S., Manfredi, G., Hu, P., Lu, J., and Bai, Y. (2007), "An Assembled Complex IV Maintains the Stability and Activity of Complex I in Mammalian Mitochondria". *Journal of Biological Chemistry* **282**: 17557-17562.
- [169] Acin-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M. P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C. T., and Enriquez, J. A. (2004), "Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria". *Molecular cell* **13**: 805-815.
- [170] Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., and Genova, M. L. (2013), "Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I". *Antioxid Redox Signal* **19**: 1469-1480.
- [171] Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quiros, P. M., Calvo, E., Rodriguez-Hernandez, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, A., Lopez-Otin, C., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., Fernandez-Vizarra, E., and Enriquez, J. A. (2013), "Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain". *Science* **340**: 1567-1570.
- [172] Papa, S., Martino, P. L., Capitanio, G., Gaballo, A., Rasmø, D. D., Signorile, A., Petruzzella, V. (2012), "Advances in mitochondrial Medicine". Dordrecht Heidelberg London New York, Springer.
- [173] Vogel, R. O., Dieteren, C. E., van den Heuvel, L. P., Willems, P. H., Smeitink, J. A., Koopman, W. J., and Nijtmans, L. G. (2007), "Identification of mitochondrial complex I assembly intermediates by tracing tagged NDUFS3 demonstrates the entry point of mitochondrial subunits". *J Biol Chem* **282**: 7582-7590.
- [174] Duncan, A. M. V., Chow, W., and Robinson, B. H. (1992), "Localization of the human 75-kDa Fe-S protein of NADH-coenzyme Q reductase gene (NDUFS1) to 2q33→q34". *Cytogenetic and Genome Research* **60**: 212-213.
- [175] Loeffen, J., Elpeleg, O., Smeitink, J., Smeets, R., Stockler-Ipsiroglu, S., Mandel, H., Sengers, R., Trijbels, F., and van den Heuvel, L. (2001), "Mutations in the complex I NDUFS2 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy". *Ann Neurol* **49**: 195-201.
- [176] Santidrian, A. F., Matsuno-Yagi, A., Ritland, M., Seo, B. B., LeBoeuf, S. E., Gay, L. J., Yagi, T., and Felding-Habermann, B. (2013), "Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression". *The Journal of Clinical Investigation* **123**: 1068-1081.
- [177] Gómez, L. A., Monette, J. S., Chavez, J. D., Maier, C. S., and Hagen, T. M. (2009), "Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **490**: 30-35.
- [178] Duncan, A. M. V., Ozawa, T., Suzuki, H., and Rozen, R. (1993), "Assignment of the Gene for the Core Protein II (UQCRC2) Subunit of the Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex to Human Chromosome 16p12". *Genomics* **18**: 455-456.

- [179] Rieske, J. S., MacLennan, D. H., and Coleman, R. (1964), "Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **15**: 338-344.
- [180] Iwata, S., Saynovits, M., Link, T. A., and Michel, H. (1996), "Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc₁ complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution". *Structure* **4**: 567-579.
- [181] Suzuki, H., Hosokawa, Y., Toda, H., Nishikimi, M., and Ozawa, T. (1990), "Common protein-binding sites in the 5'-flanking regions of human genes for cytochrome c₁ and ubiquinone-binding protein". *J Biol Chem* **265**: 8159-8163.
- [182] Zeviani, M., Masanori, N., Herbert, J., Lomax, M. I., Grossman, L. I., Sherbany, A. A., Miranda, A. F., DiMauro, S., and Schon, E. A. (1987), "Isolation of a cDNA clone encoding subunit IV of human cytochrome c oxidase". *Gene* **55**: 205-217.
- [183] Lomax, M. I., Welch, M. D., Darras, B. T., Francke, U., and Grossman, L. I. (1990), "Novel use of a chimpanzee pseudogene for chromosomal mapping of human cytochrome c oxidase subunitIV". *Gene* **86**: 209-216.
- [184] Aras, S., Pak, O., Sommer, N., Finley, R., Jr., Huttemann, M., Weissmann, N., and Grossman, L. I. (2013), "Oxygen-dependent expression of cytochrome c oxidase subunit 4-2 gene expression is mediated by transcription factors RBPJ, CXXC5 and CHCHD2". *Nucleic Acids Res* **41**: 2255-2266.
- [185] Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2015), "Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution". *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 13231-13236.
- [186] Habersetzer, J., Ziani, W., Larrieu, I., Stines-Chaumeil, C., Giraud, M.-F., Brèthes, D., Dautant, A., and Paumard, P. (2013), "ATP synthase oligomerization: From the enzyme models to the mitochondrial morphology". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **45**: 99-105.
- [187] Tretter, L. and Adam-Vizi, V. (2005), "Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**: 2335-2345.
- [188] Johnson, R. B., Fearon, K., Mason, T., and Jindal, S. (1989), "Cloning and characterization of the yeast chaperonin HSP60 gene". *Gene* **84**: 295-302.
- [189] Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1994), "The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å". *Nature* **371**: 578-86.
- [190] Herendeen, S. L., VanBogelen, R. A., and Neidhardt, F. C. (1979), "Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures". *J Bacteriol* **139**: 185-194.
- [191] Oori, K. E., Aoyama, T., Wakui, K., Fukushima, Y., Miyajima, H., Yamaguchi, S., Oori, T., Kondo, N., and Hashimoto, T. (1997), "Genomic and mutational analysis of the mitochondrial trifunctional protein beta-subunit (HADHB) gene in patients with trifunctional protein deficiency". *Hum Mol Genet* **6**: 1215-1224.
- [192] Leydiker, K. B., Neidich, J. A., Lorey, F., Barr, E. M., Puckett, R. L., Lobo, R. M., and Abdenur, J. E. (2011), "Maternal medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency identified by newborn screening". *Molecular Genetics and Metabolism* **103**: 92-95.
- [193] Herrmann, T., Buchkremer, F., Gosch, I., Hall, A. M., Bernlohr, D. A., and Stremmel, W. (2001), "Mouse fatty acid transport protein 4 (FATP4): Characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase". *Gene* **270**: 31-40.
- [194] Jia, Z., Moulson, C. L., Pei, Z., Miner, J. H., and Watkins, P. A. (2007), "Fatty acid transport protein 4 is the principal very long chain fatty acyl-CoA synthetase in skin fibroblasts". *J Biol Chem* **282**: 20573-20583.
- [195] Narula, N., Zaragoza, M. V., Sengupta, P. P., Li, P., Haider, N., Verjans, J., Waymire, K., Vannan, M., and Wallace, D. C. (2011), "Adenine nucleotide translocase 1 deficiency results in dilated cardiomyopathy with defects in myocardial mechanics, histopathological alterations, and activation of apoptosis". *JACC Cardiovasc Imaging* **4**: 1-10.
- [196] Mayr, J. A., Merkel, O., Kohlwein, S. D., Gebhardt, B. R., Bohles, H., Fotschl, U., Koch, J., Jaksch, M., Lochmuller, H., Horvath, R., Freisinger, P., and Sperl, W. (2007), "Mitochondrial phosphate-carrier deficiency: a novel disorder of oxidative phosphorylation". *Am J Hum Genet* **80**: 478-484.

- [197] Nuskova, H., Mracek, T., Mikulova, T., Vrbacky, M., Kovarova, N., Kovalcikova, J., Pecina, P., and Houstek, J. (2015), "Mitochondrial ATP synthasome: Expression and structural interaction of its components". *Biochem Biophys Res Commun* **464**: 787-793.
- [198] Chen, C., Ko, Y., Delannoy, M., Ludtke, S. J., Chiu, W., and Pedersen, P. L. (2004), "Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP". *J Biol Chem* **279**: 31761-31768.
- [199] Cicek, G., Schiltz, E., Hess, D., Staiger, J., and Brandsch, R. (2002), "Analysis of mitochondrial antigens reveals inner membrane succinate dehydrogenase flavoprotein subunit as autoantigen to antibodies in anti-M7 sera". *Clinical and Experimental Immunology* **128**: 83-87.
- [200] Kovářová, N., Mráček, T., Nůsková, H., Holzerová, E., Vrbacký, M., Pecina, P., Hejzlarová, K., Klůčková, K., Rohlena, J., Neuzil, J., and Houštěk, J. (2013), "High Molecular Weight Forms of Mammalian Respiratory Chain Complex II". *PLoS ONE* **8**: e71869.
- [201] Zhou, A., Rohou, A., Schep, D. G., Bason, J. V., Montgomery, M. G., Walker, J. E., Grigorieff, N., and Rubinstein, J. L. (2015), "Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM". *Elife* **4**.
- [202] Buzhynskyy, N., Sens, P., Prima, V., Sturgis, J. N., and Scheuring, S. (2007), "Rows of ATP Synthase Dimers in Native Mitochondrial Inner Membranes". *Biophysical Journal* **93**: 2870-2876.
- [203] Dudkina, N. V., Oostergetel, G. T., Lewejohann, D., Braun, H.-P., and Boekema, E. J. (2010), "Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by cryo-electron tomography". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1797**: 272-277.
- [204] Brandt, U. (2006), "Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I)". *Annu Rev Biochem* **75**: 69-92.
- [205] Gao, X., Wen, X., Esser, L., Quinn, B., Yu, L., Yu, C. A., and Xia, D. (2003), "Structural basis for the quinone reduction in the bc1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Q_i site". *Biochemistry* **42**: 9067-9080.
- [206] Schägger, H., Brandt, U., Gencic, S., and von Jagow, G. (1995), "Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria". *Methods in Enzymology* **260**: 82-96.
- [207] Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y.-I., Kim, K. K., Hung, L.-W., Crofts, A. R., Berry, E. A., and Kim, S.-H. (1998), "Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1". *Nature* **392**: 677-684.
- [208] Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., and Kannt, A. (1998), "Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy". *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**: 329-356.
- [209] Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., and Tsukihara, T. (1998), "Crystal Structure and Reaction Mechanism of Bovine Heart Cytochrome c Oxidase". *Oxygen Homeostasis and Its Dynamics* **1**: 13-23.
- [210] Cruciat, C. M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., and Stuart, R. A. (2000), "The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria". *J Biol Chem* **275**: 18093-18098.
- [211] Cheng, M. Y., Hartl, F. U., and Norwich, A. L. (1990), "The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly". *Nature* **348**: 455-458.
- [212] Nakamura, J., Fujikawa, M., and Yoshida, M. (2013), "IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice". *Bioscience Reports* **33**.
- [213] Tomasetig, L., Di Pancrazio, F., Harris, D. A., Mavelli, I., and Lippe, G. (2002), "Dimerization of F₀F₁ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF1". *Biochim Biophys Acta* **1556**: 133-141.
- [214] Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., García-Consuegra, I., Martín, Miguel A., Arenas, J., Barrientos, A., and Ugalde, C. (2012), "Mitochondrial Complex I Plays an Essential Role in Human Respirasome Assembly". *Cell Metabolism* **15**: 324-335.
- [215] Seelert, H., Dani, D. N., Dante, S., Hauss, T., Krause, F., Schäfer, E., Frenzel, M., Poetsch, A., Rexroth, S., Schwassmann, H. J., Suhai, T., Vonck, J., and Dencher, N. A. (2009), "From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes". *Biochim Biophys Acta* **1787**: 657-671.

- [216] van Lis, R., Mendoza-Hernández, G., Groth, G., and Atteia, A. (2007), "New Insights into the Unique Structure of the F(0)F(1)-ATP Synthase from the Chlamydomonad Algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*". *Plant Physiology* **144**: 1190-1199.
- [217] Poetsch, A. (2000), "Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H⁺-ATP synthase purified by blue native electrophoresis.pdf".
- [218] Wittig, I., Meyer, B., Heide, H., Steger, M., Bleier, L., Wumaier, Z., Karas, M., and Schagger, H. (2010), "Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1797**: 1004-1011.
- [219] Meyer, B., Wittig, I., Trifilieff, E., Karas, M., and Schagger, H. (2007), "Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase". *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 1690-1699.
- [220] Krause, F., Scheckhuber, C. Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N. H., Dencher, N. A., and Osiewacz, H. D. (2004), "Supramolecular Organization of Cytochrome c Oxidase- and Alternative Oxidase-dependent Respiratory Chains in the Filamentous Fungus *Podospora anserina*". *Journal of Biological Chemistry* **279**: 26453-26461.
- [221] Dencher, N. A., Frenzel, M., Reifschneider, N. H., Sugawa, M., and Krause, F. (2007), "Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging". *Ann N Y Acad Sci* **1100**: 291-298.
- [222] Harris, E. H. (2009), "The Chlamydomonas sourcebook - Organellar and Metabolic Processes". Bd. 2, Academic Press, 2. Aufl.
- [223] Seelert, H. and Dencher, N. A. (2011), "ATP synthase superassemblies in animals and plants: two or more are better". *Biochim Biophys Acta* **1807**: 1185-1197.
- [224] Pullman, M. E. and Monroy, G. C. (1963), "A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase". *J Biol Chem* **238**: 3762-3769.
- [225] Cabezon, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2003), "The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1". *Nat Struct Biol* **10**: 744-750.
- [226] Faccenda, D. and Campanella, M. (2012), "Molecular Regulation of the Mitochondrial F1Fo-ATP synthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF1)". *International Journal of Cell Biology* **2012**: 12.
- [227] Seelert, H. (2011), "Von Protonenturbinen zu Respirasomen: Isolierung und strukturelle Charakterisierung energieumwandelnder Membranproteine". Habilitation, Technische Universität Darmstadt.
- [228] Goedderz, D. (2013), "Optimierung von OxPhosAktivitätstests In-Lösung und In-Gel". Bachelorarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [229] Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R. F., and Remacle, C. (2004), "Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes". *Biochim Biophys Acta* **1658**: 212-224.
- [230] Xie, B., Bishop, S., Stessman, D., Wright, D., Spalding, M. H., and Halverson, L. J. (2013), "*Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B12-producing bacteria". *Isme j* **7**: 1544-1555.
- [231] Krause, F., Reifschneider, N. H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S., and Dencher, N. A. (2004), "'Respirasome'-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach". *J Biol Chem* **279**: 48369-48375.
- [232] Kemski, S. (2014), "Isolierung und Charakterisierung von Membran-Proteinkomplexen aus Pflanzen und Tieren". Masterarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [233] Lenaz, G. (2012), "Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology?". *Adv Exp Med Biol* **942**: 93-136.
- [234] Liochev, S. I. (2013), "Reactive oxygen species and the free radical theory of aging". *Free Radic Biol Med* **60**: 1-4.
- [235] Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M., and Klingenberg, M. (1982), "Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from beef heart mitochondria". *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **363**: 345-349.

-
-
- [236] Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. M., and Brandolin, G. (2003), "Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside". *Nature* **426**: 39-44.
- [237] Feller, U., Anders, I., and Mae, T. (2008), "Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated". *Journal of Experimental Botany* **59**: 1615-1624.
- [238] Dhingra, A., Portis, A. R., and Daniell, H. (2004), "Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6315-6320.
- [239] Curmi, P. M., Cascio, D., Sweet, R. M., Eisenberg, D., and Schreuder, H. (1992), "Crystal structure of the unactivated form of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from tobacco refined at 2.0-Å resolution". *J Biol Chem* **267**: 16980-16989.
- [240] Schneider, G., Lindqvist, Y., Brändén, C.-I., and Lorimer, G. (1986), "Three-dimensional structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum* at 2.9 Å resolution". *The EMBO Journal* **5**: 3409-3415.
- [241] Gobets, B. and van Grondelle, R. (2001), "Energy transfer and trapping in photosystem I". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1507**: 80-99.
- [242] Vinyard, D. J., Ananyev, G. M., and Dismukes, G. C. (2013), "Photosystem II: the reaction center of oxygenic photosynthesis". *Annu Rev Biochem* **82**: 577-606.
- [243] Seelert, H., Poetsch, A., Rohlf, M., and Dencher, N. A. (2000), "Dye-ligand chromatographic purification of intact multisubunit membrane protein complexes application to the chloroplast (2000)". *Biochem. J.* **346**: 41-44.



8 Anhang

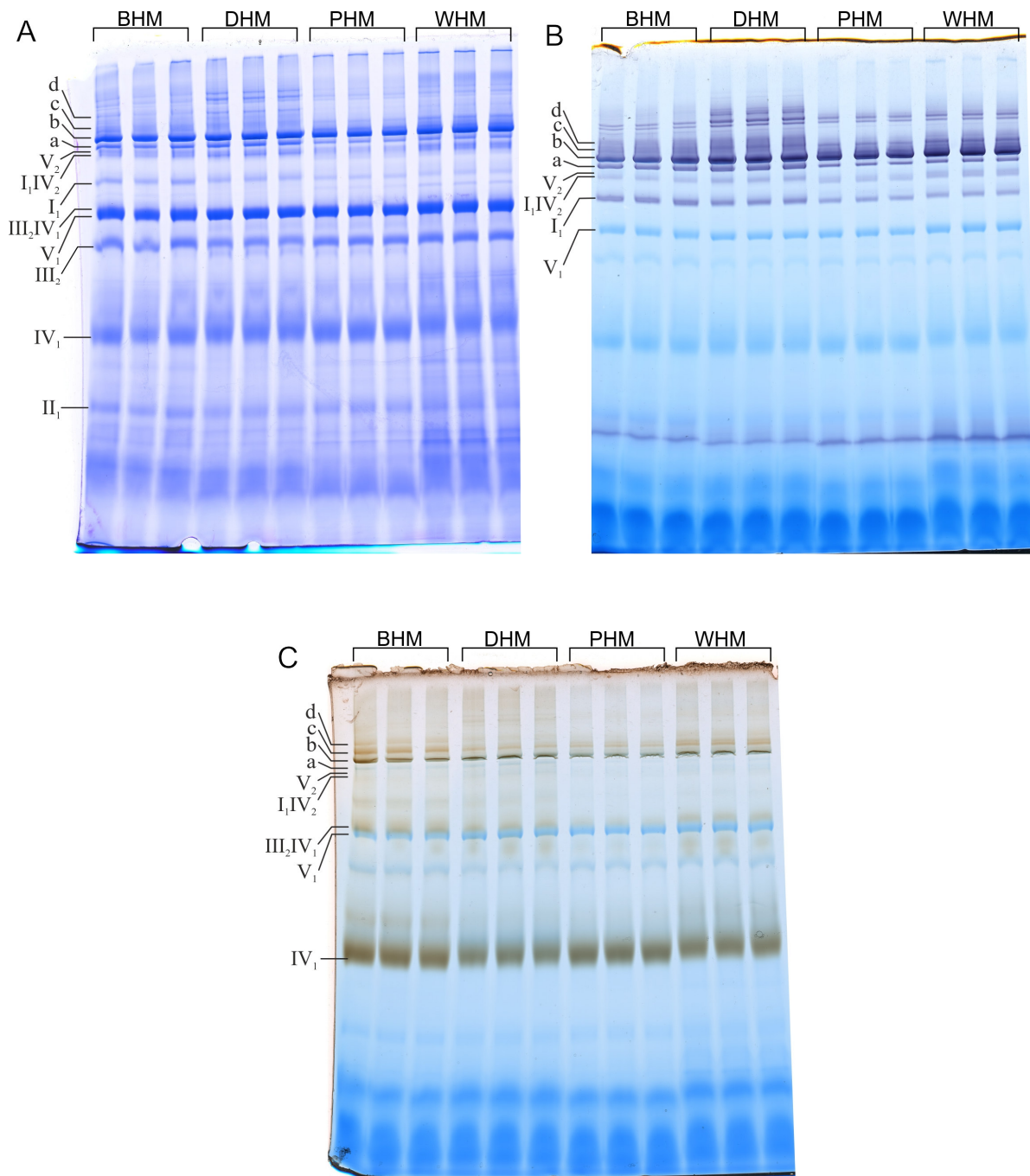


Abbildung 8.1: solubilisierte Rinderherzmitochondrien (BHM), Rehherzmitochondrien (DHM), Schweineherzmitochondrien (PHM) und Wildschweinherzmitochondrien (WHM) auf einem Coomassie-gefärbten BN-Gel (A), einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (B) und für Komplex IV (C). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM, DHM, PHM und WHM auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

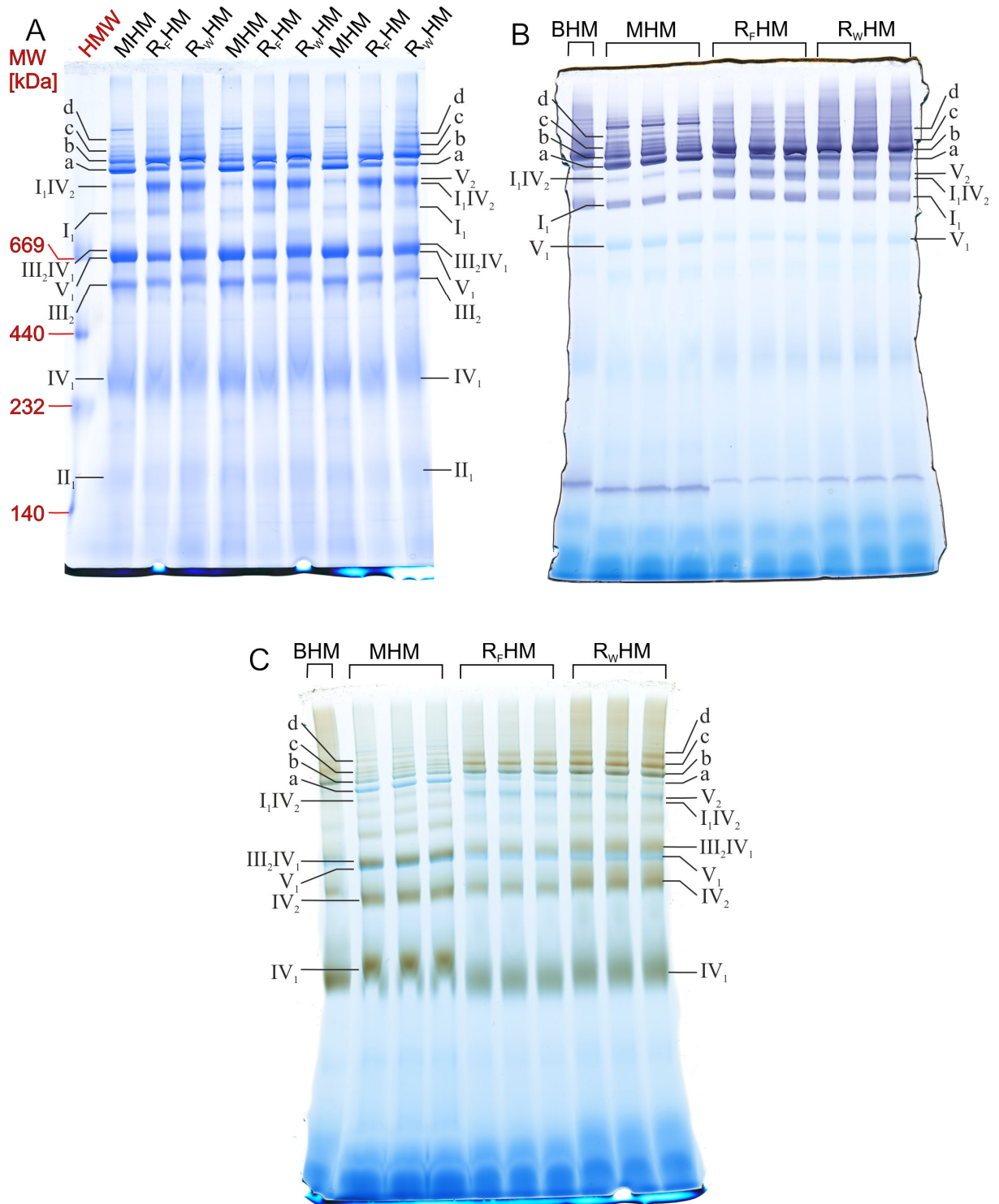


Abbildung 8.2: solubilisierte Mäuseherzmitochondrien (MHM) und Rattenherzmitochondrien (Fischer R_FHM und Wistar R_WHM) auf einem Coomassie-gefärbten BN-Gel (A), einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (B) und für Komplex IV (C). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 4 g/g für MHM, und 3 g/g für R_FHM und R_WHM) auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Für die Coomassie-Färbung wurden 4 µL HMW (rot) auf das Gel als Proteinmassenstandard gegeben, für die Aktivitätstests wurde BHM (100 µg vor Solub., 3 g/g) als Standard verwendet. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

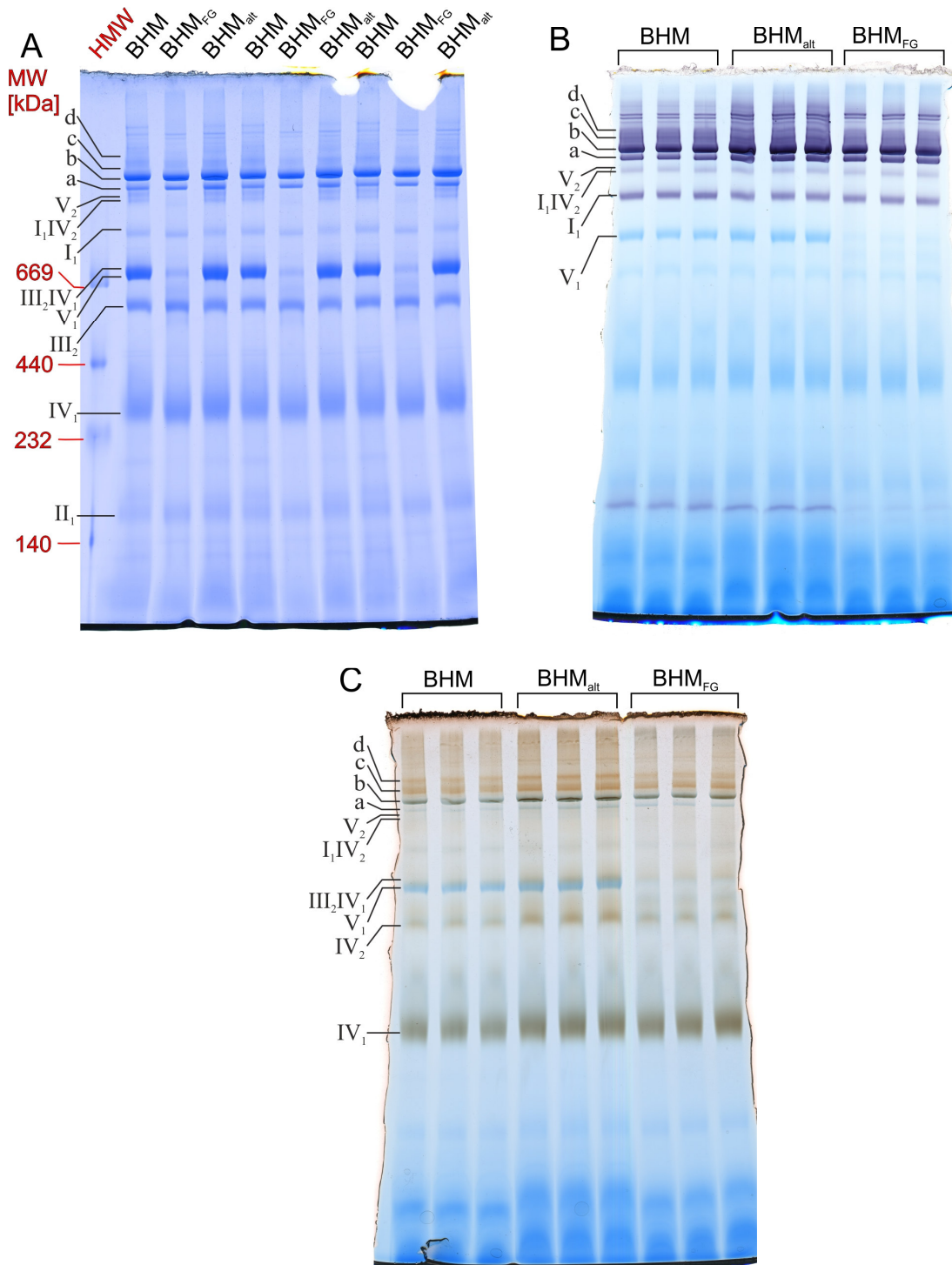


Abbildung 8.3: solubilisierte Rinderherzmitochondrien (BHM), Rinderherzmitochondrien alt (BHM_{alt}) und Rinderherzmitochondrien falsch gelagert (BHM_{FG}) auf einem Coomassie-gefärbten BN-Gel (A), einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (B) und für Komplex IV (C). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM, BHM_{alt} und BHM_{FG} auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Für die Coomassie-Färbung wurden 4 µL HMW (rot) auf das Gel als Proteinmassenstandard gegeben, für die Aktivitätstests wurde BHM (100 µg vor Solub., 3 g/g) als Standard verwendet. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

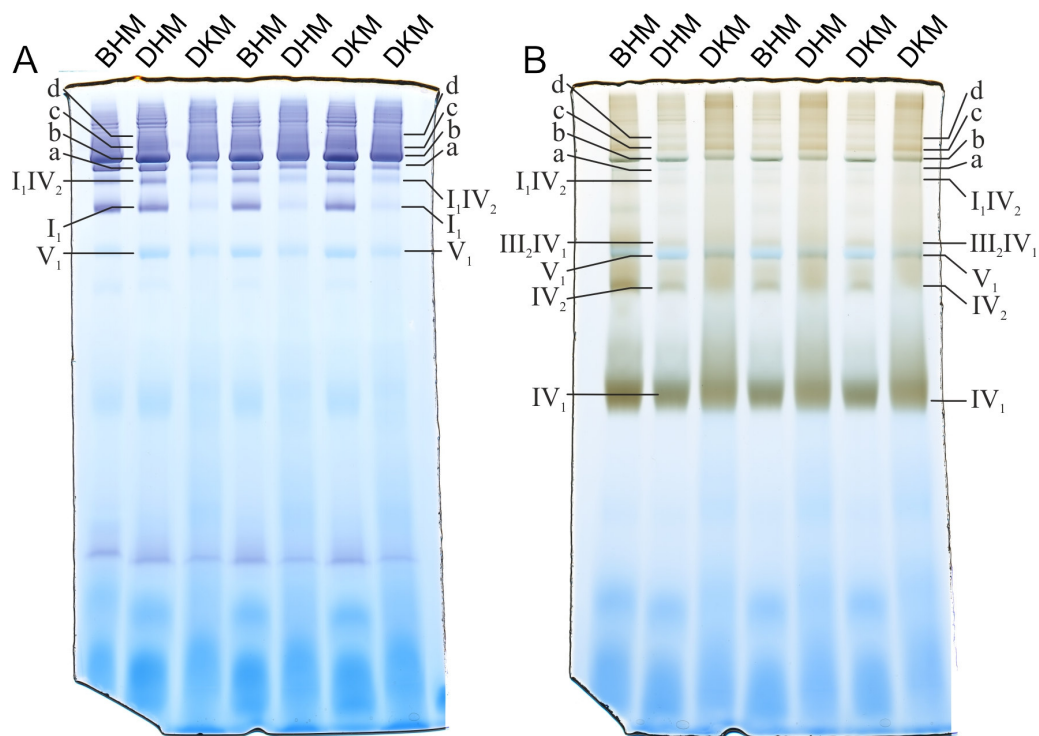


Abbildung 8.4: solubilisierte Rehherzmitochondrien (DHM) und Rehnieremitochondrien (DKM) auf einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (A) und für Komplex IV (B). Es wurden pro Spur jeweils 100 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von DHM und DKM auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Als Proteinmassenstandard wurde BHM (100 µg vor Solub., 3 g/g) auf das Gel gegeben. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃. Diese Aktivitätstests wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] durchgeführt.

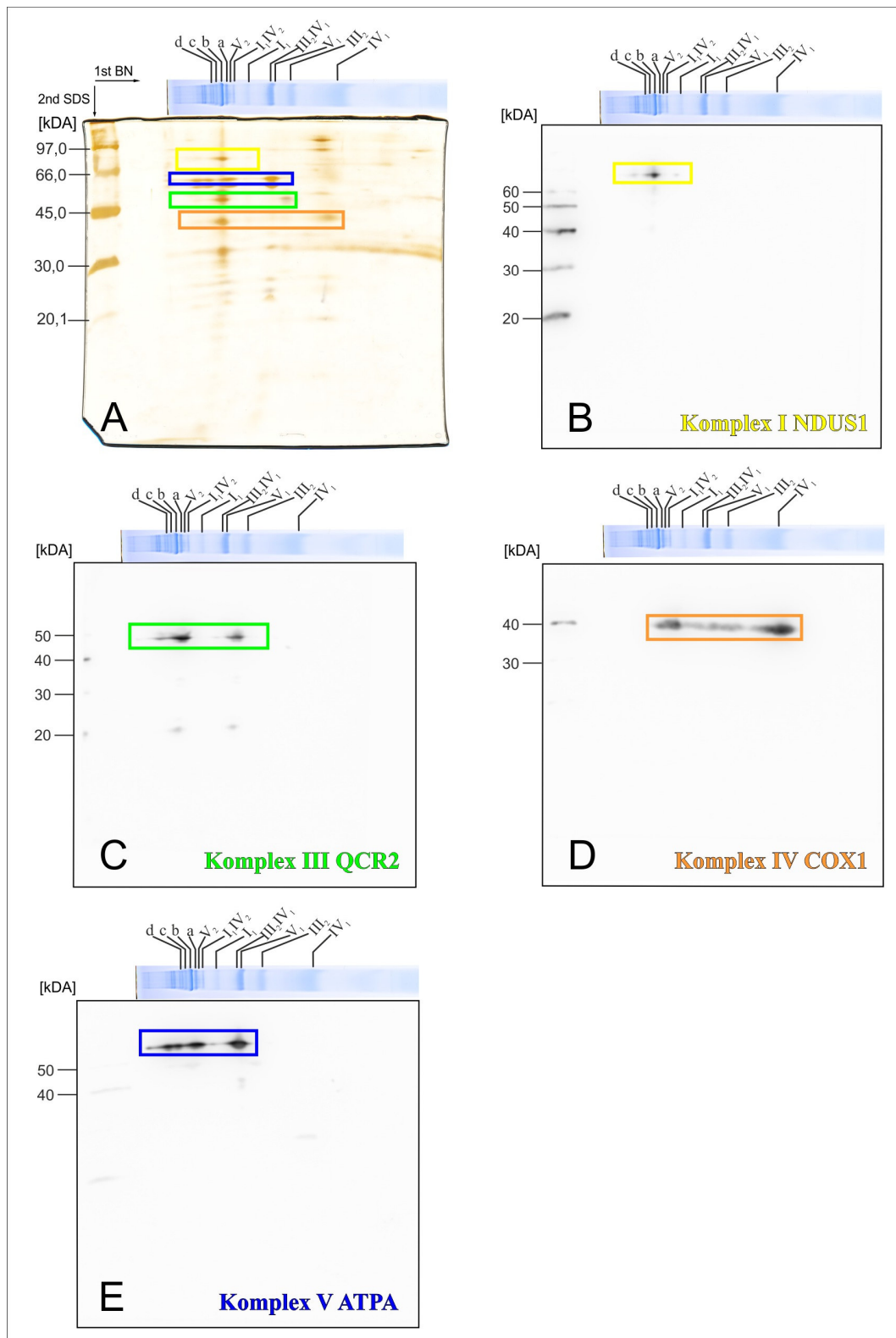


Abbildung 8.5: 2-D Western Blots der OxPhos-Komplexe I, III, IV und V von DHM. Es wurden 35 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von DHM mittels 2-D BN/SDS-PAGE (mittlere Größe) aufgetrennt. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel bzw. den Blot gelegt. **A:** Silber-gefärbtes 2-D Gel, **B:** Western Blot gegen NDUS1 (Komplex I); **C:** Western Blot gegen QCR2 (Komplex III); **D:** Western Blot gegen COX1 (Komplex IV); **E:** Western Blot gegen ATPA (Komplex V). Als Massenstandard wurde der LMW-Marker (**A**) bzw. der MagicMark™ XP (**B** - **E**) verwendet. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃. Diese Western Blots wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] durchgeführt.

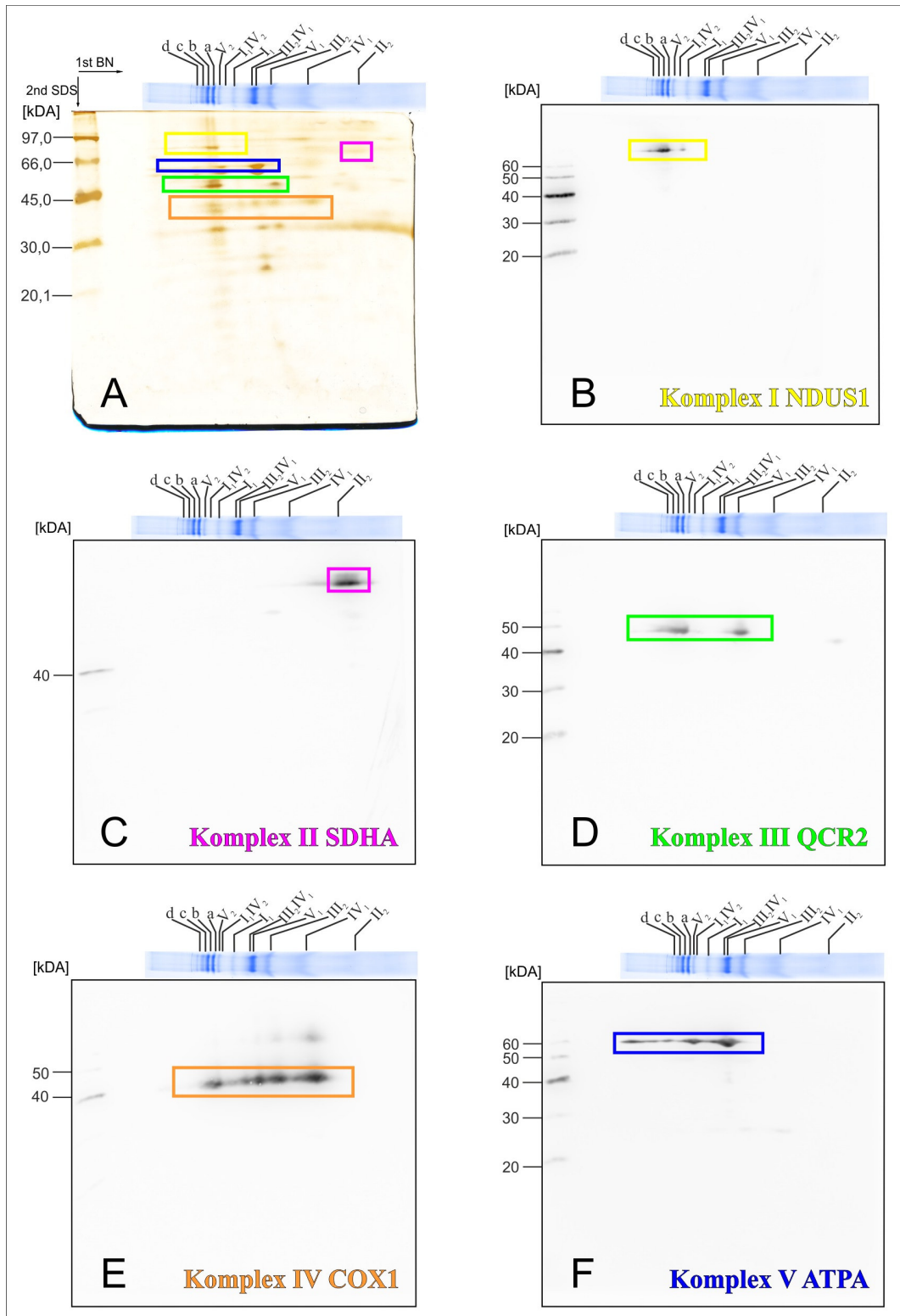


Abbildung 8.6: 2-D Western Blots der OxPhos-Komplexe I, II, III, IV und V von MHM. Es wurden 30 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 4 g/g) von MHM mittels 2-D BN/SDS-PAGE (mittlere Größe) aufgetrennt. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel bzw. den Blot gelegt. **A:** Silber-gefärbtes 2-D Gel, **B:** Western Blot gegen NDUS1 (Komplex I); **C:** Western Blot gegen SDHA (Komplex II); **D:** Western Blot gegen QCR2 (Komplex III); **E:** Western Blot gegen COX1 (Komplex IV); **F:** Western Blot gegen ATPA (Komplex V). Als Massenstandard wurde der LMW-Marker (**A**) bzw. der MagicMark™ XP (**B** - **F**) verwendet. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃. Diese Western Blots wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] durchgeführt.

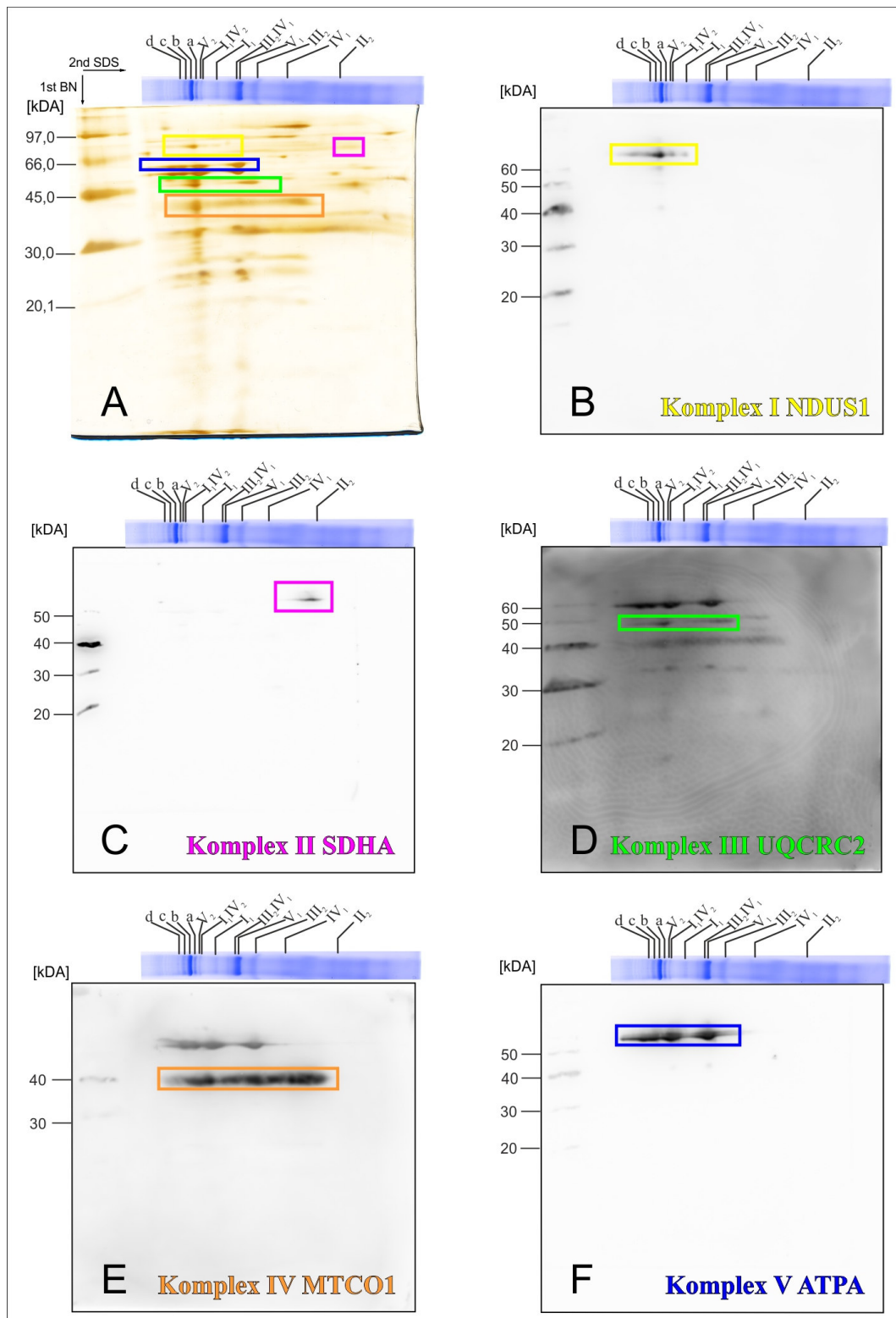


Abbildung 8.7: 2-D Western Blots der OxPhos-Komplexe I, II, IV und V von PHM. Es wurden 30 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von PHM mittels 2-D BN/SDS-PAGE (mittlere Größe) aufgetrennt. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel bzw. den Blot gelegt. **A:** Silber-gefärbtes 2-D Gel, **B:** Western Blot gegen NDUS1 (Komplex I); **C:** Western Blot gegen SDHA (Komplex II); **D:** Blot gegen COX1 (Komplex IV); **E:** Western Blot gegen ATPA (Komplex V). Als Massenstandard wurde der LMW-Marker (**A**) bzw. der MagicMark™ XP (**B** - **E**) verwendet. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃. Diese Western Blots wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] durchgeführt.

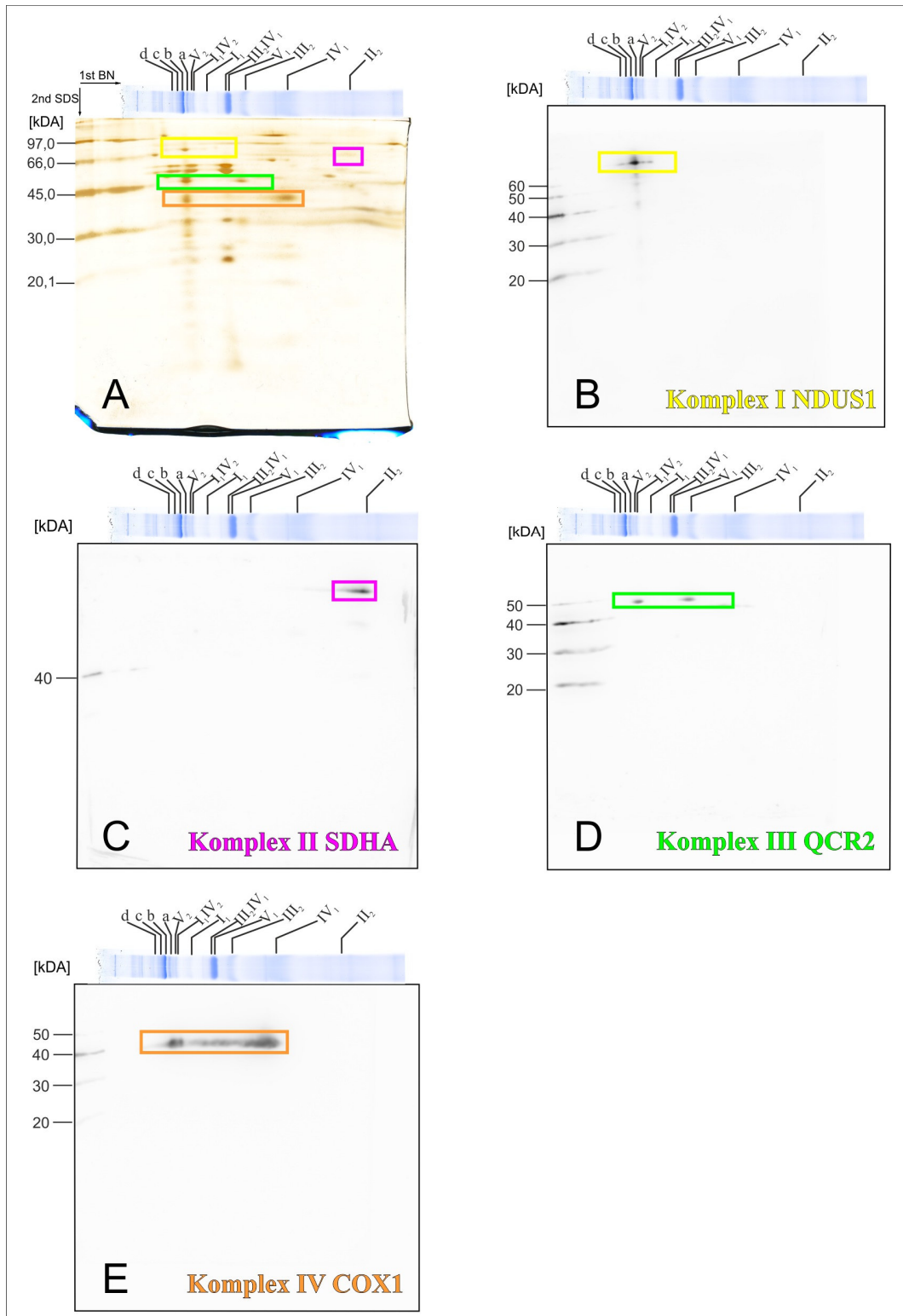


Abbildung 8.8: 2-D Western Blots der OxPhos-Komplexe I, II, III und IV von WHM. Es wurden 30 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von WHM mittels 2-D BN/SDS-PAGE (mittlere Größe) aufgetrennt. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel bzw. den Blot gelegt. **A:** Silber-gefärbtes 2-D Gel, **B:** Western Blot gegen NDUS1 (Komplex I); **C:** Western Blot gegen SDHA (Komplex II); **D:** Western Blot gegen QCR2 (Komplex III); **E:** Western Blot gegen COX1 (Komplex IV). Als Massenstandard wurde der LMW-Marker (**A**) bzw. der MagicMark™ XP (**B** - **E**) verwendet. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃. Diese Western Blots wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Olga Ankudin^[89] durchgeführt.

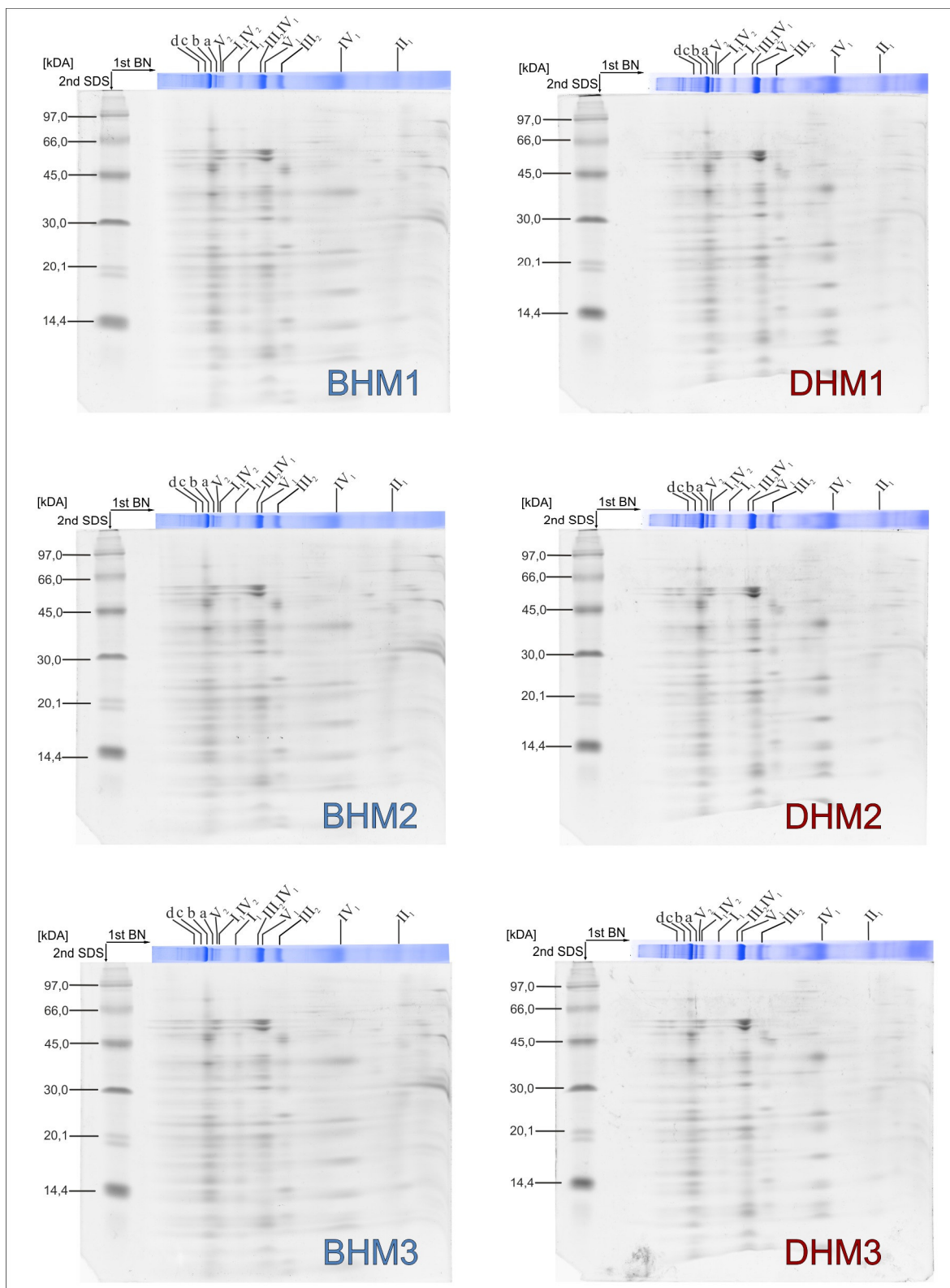


Abbildung 8.9: Sypro® Ruby-gefärbte 2-D BN/SDS-Gele von BHM und DHM. Es wurden jeweils 120 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von DHM und BHM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Dargestellt sind 3 technische Replikate. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links). Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

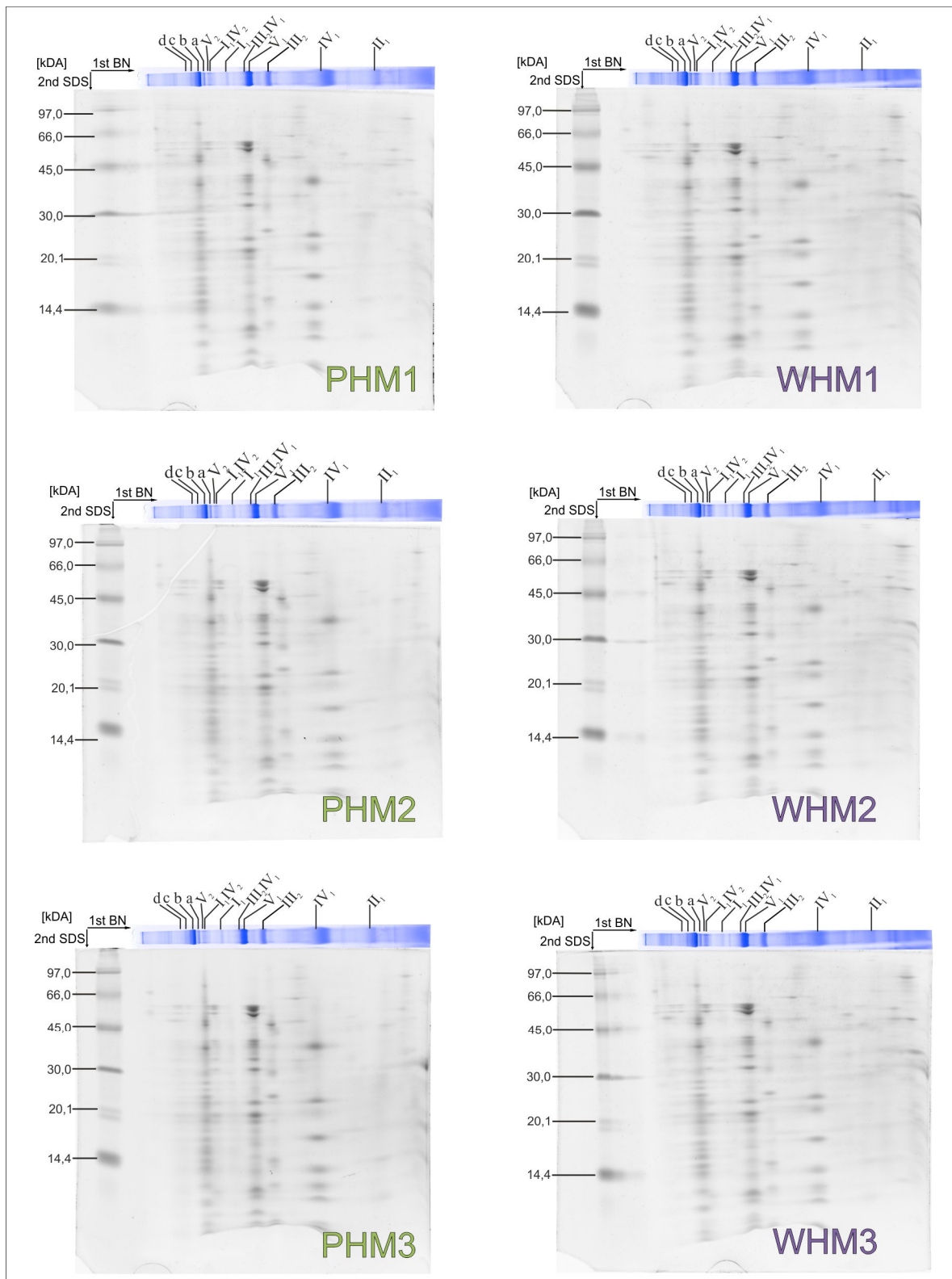


Abbildung 8.10: Sypro® Ruby-gefärbte 2-D BN/SDS-Gele von PHM und WHM. Es wurden jeweils 120 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von PHM und WHM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Dargestellt sind 3 technische Replikate. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links). Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

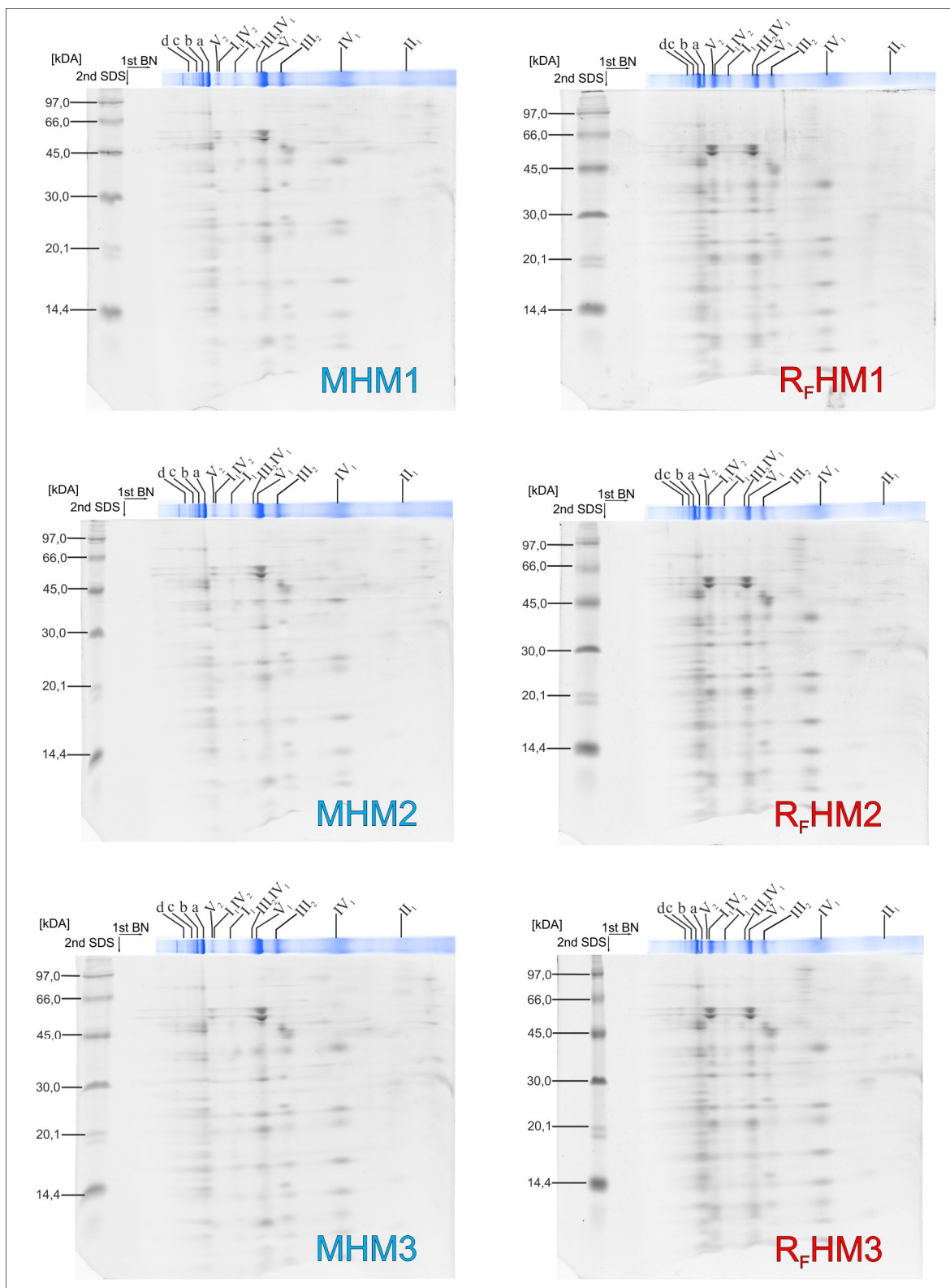


Abbildung 8.11: Sypro® Ruby-gefärbte 2-D BN/SDS-Gele von MHM und R_FHM. Es wurden jeweils 120 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis für MHM 4 g/g und R_FHM 3 g/g) von MHM und R_FHM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Dargestellt sind 3 technische Replikate. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links). Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

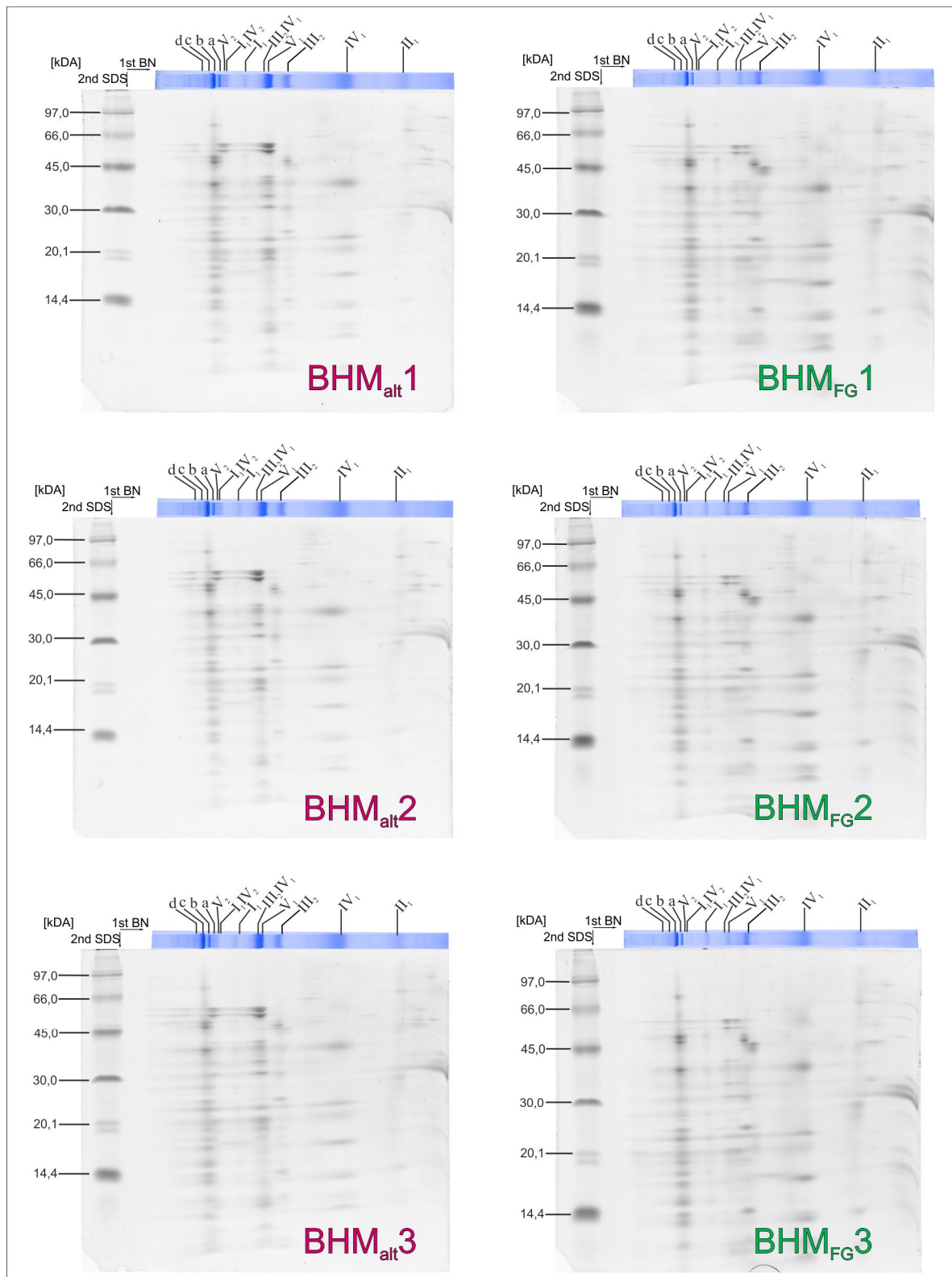


Abbildung 8.12: Sypro® Ruby-gefärbte 2-D BN/SDS-Gele von BHM_{alt} und BHM_{FG}. Es wurden jeweils 120 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von BHM_{alt} und BHM_{FG} mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Dargestellt sind 3 technische Replikate. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massensstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links). Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

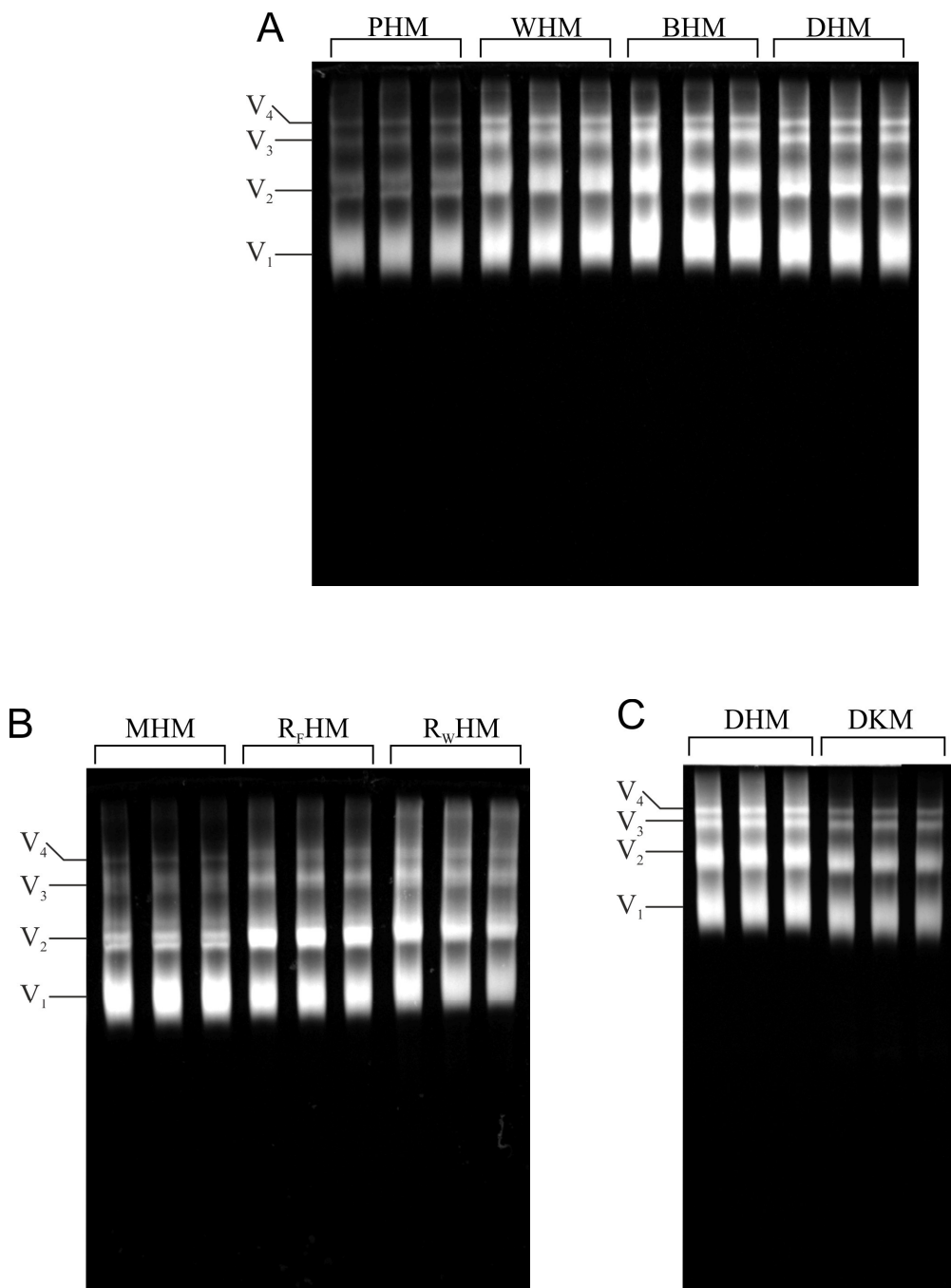


Abbildung 8.13: In-Gel ATP-Hydrolyse-Aktivitätstest für Komplex V in einem CN-Gel von BHM, DHM, PHM und WHM (A), von MHM, R_FHM und R_WHM (B), von DHM und DKM (C). Es wurden pro Spur jeweils 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 4 g/g für MHM, andere Proben 3 g/g) auf ein großes CN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 9 %, C = 3 %) aufgetragen.

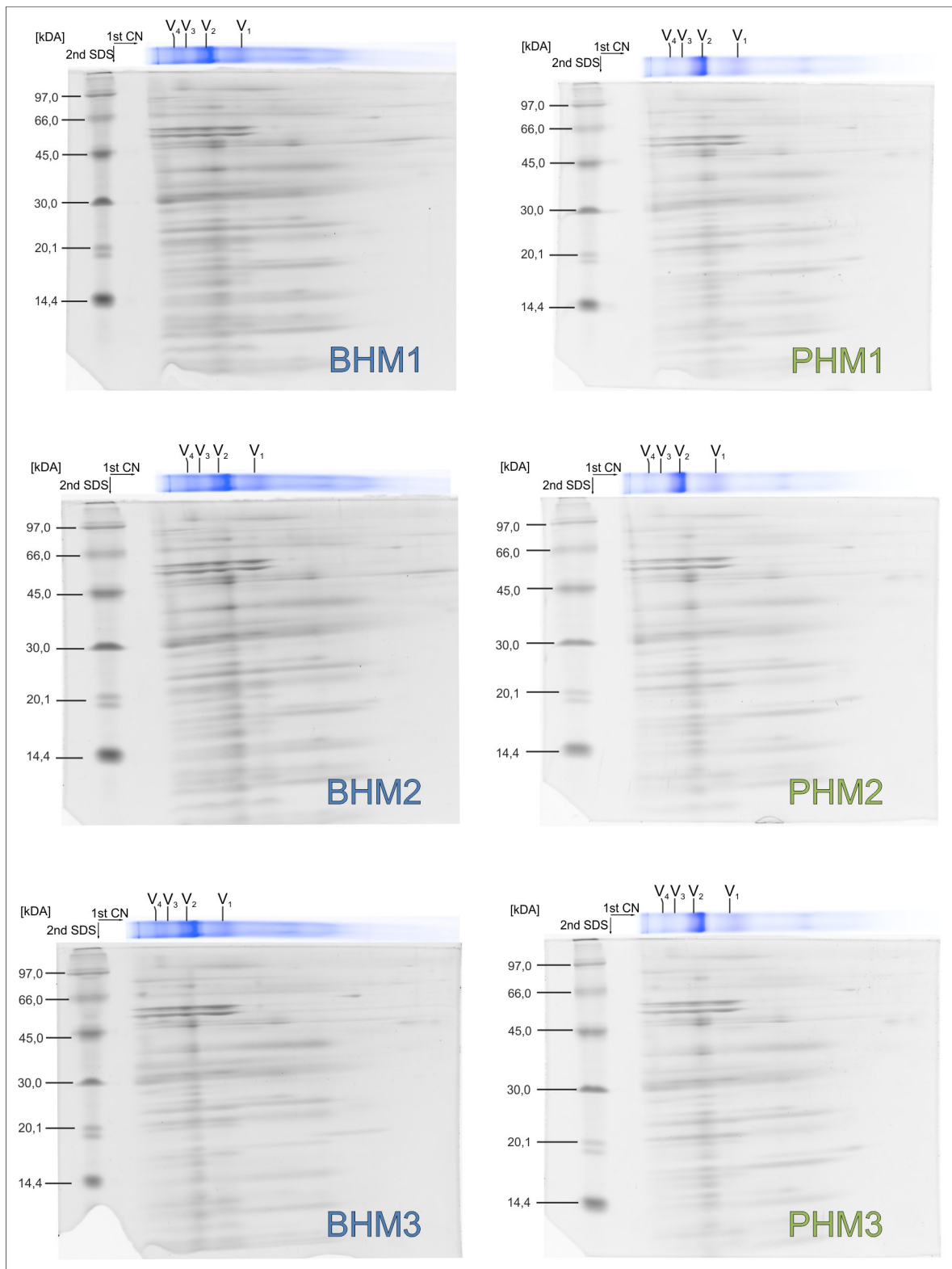


Abbildung 8.14: Sypro® Ruby-gefärbte 2-D CN/SDS-Gele von BHM und PHM. Es wurden jeweils 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von DHM und PHM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Dargestellt sind 3 technische Replikate. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links).

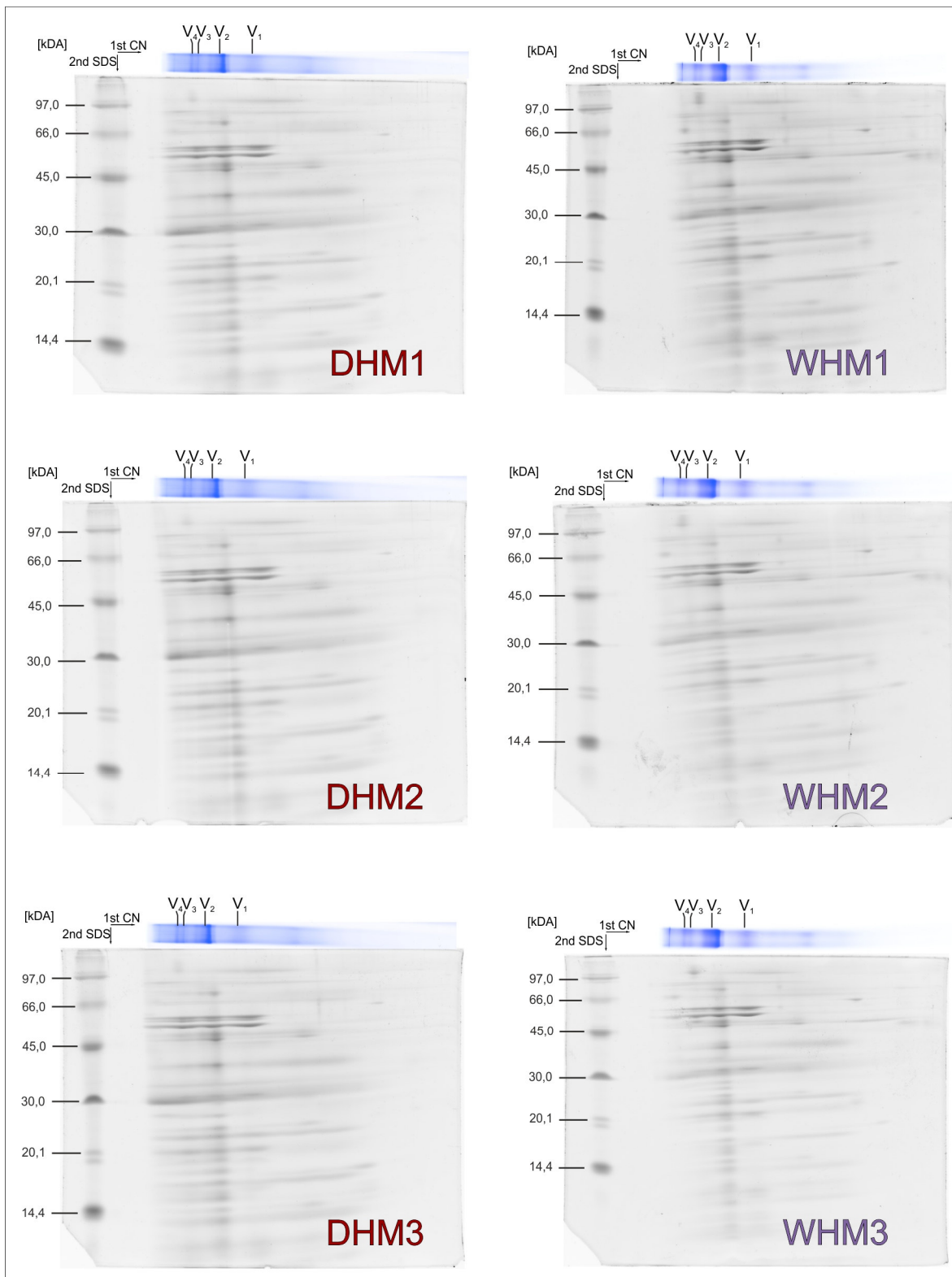


Abbildung 8.15: Sypro® Ruby-gefärbte 2-D CN/SDS-Gele von DHM und WHM. Es wurden jeweils 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von DHM und WHM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Dargestellt sind 3 technische Replikate. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links).

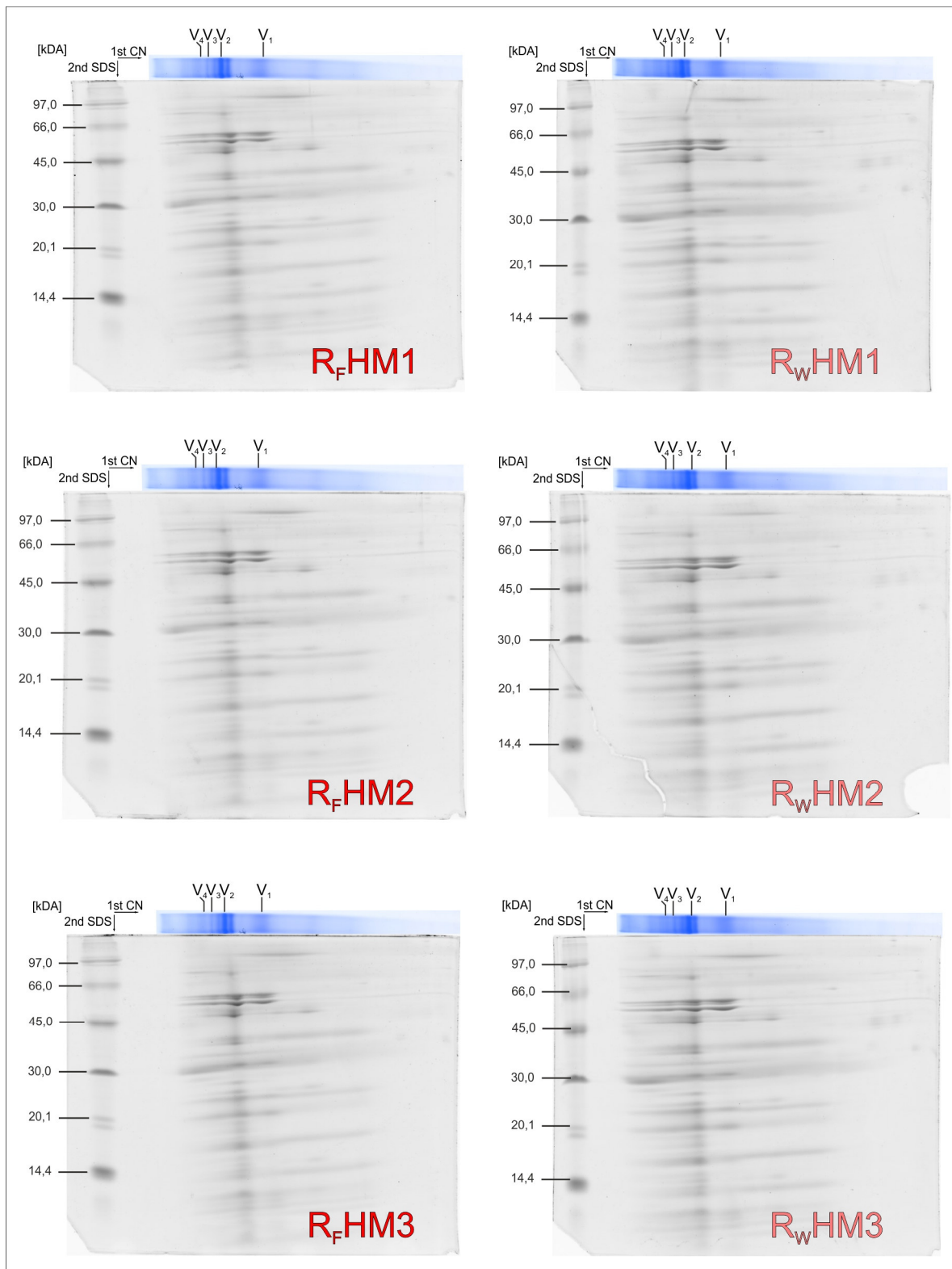


Abbildung 8.16: Sypro® Ruby-gefärbte 2-D CN/SDS-Gele von R_F HM und R_W HM. Es wurden jeweils 140 μ g Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 3 g/g) von R_F HM und R_W HM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Dargestellt sind 3 technische Replikate. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links).

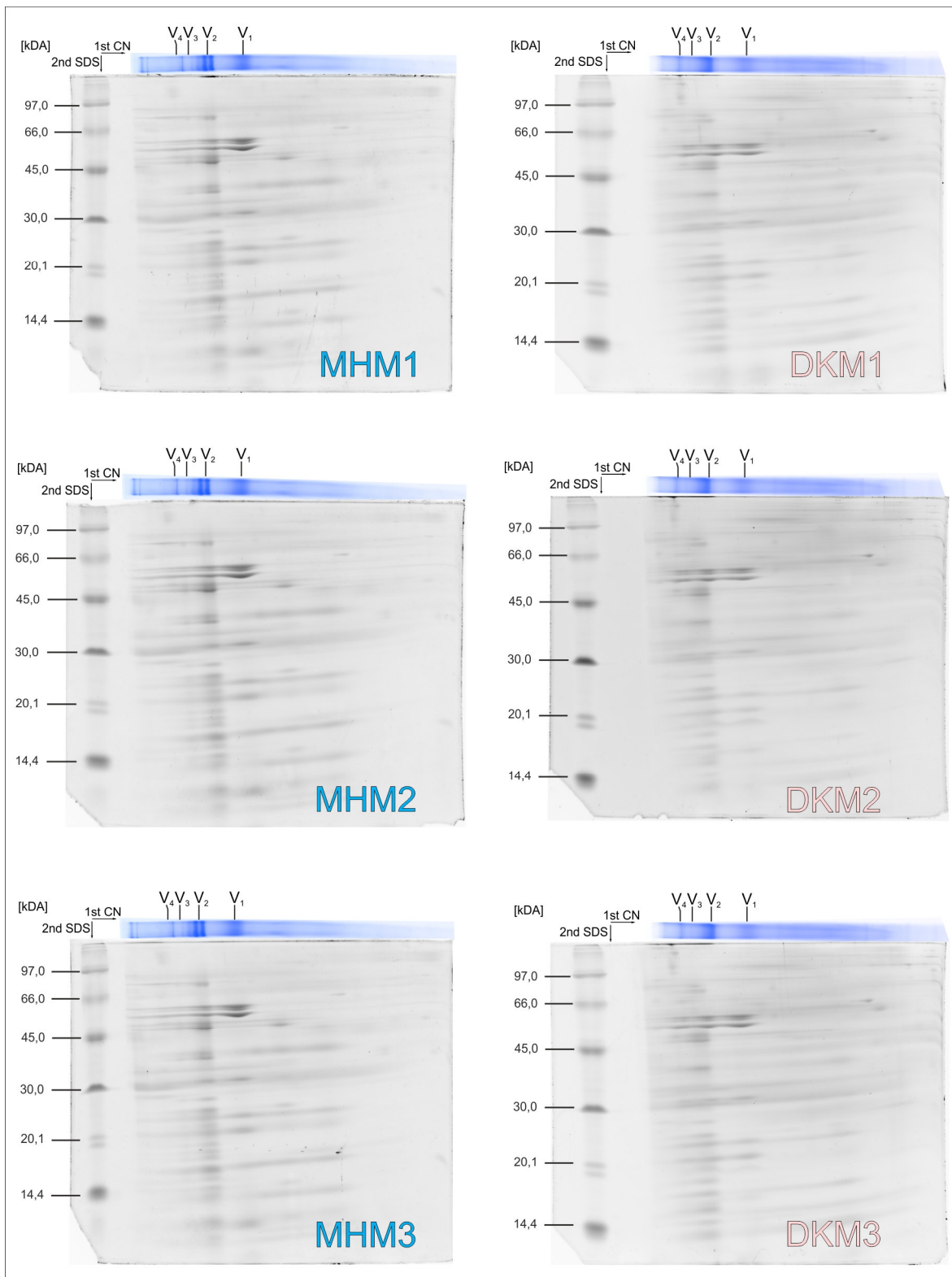


Abbildung 8.17: Sypro® Ruby-gefärbte 2-D CN/SDS-Gele von MHM und DKM. Es wurden jeweils 140 µg Protein (vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis von 4 g/g für MHM und 3 g/g für DKM) von MHM und DKM mittels 2-D PAGE aufgetrennt. Dargestellt sind 3 technische Replikate. Ein mit Coomassie gefärbter BN-Gelstreifen der Probe wurde zur besseren Zuordnung an das SDS-Gel gelegt. Als Massenstandard wurde der LMW-Marker verwendet (links).

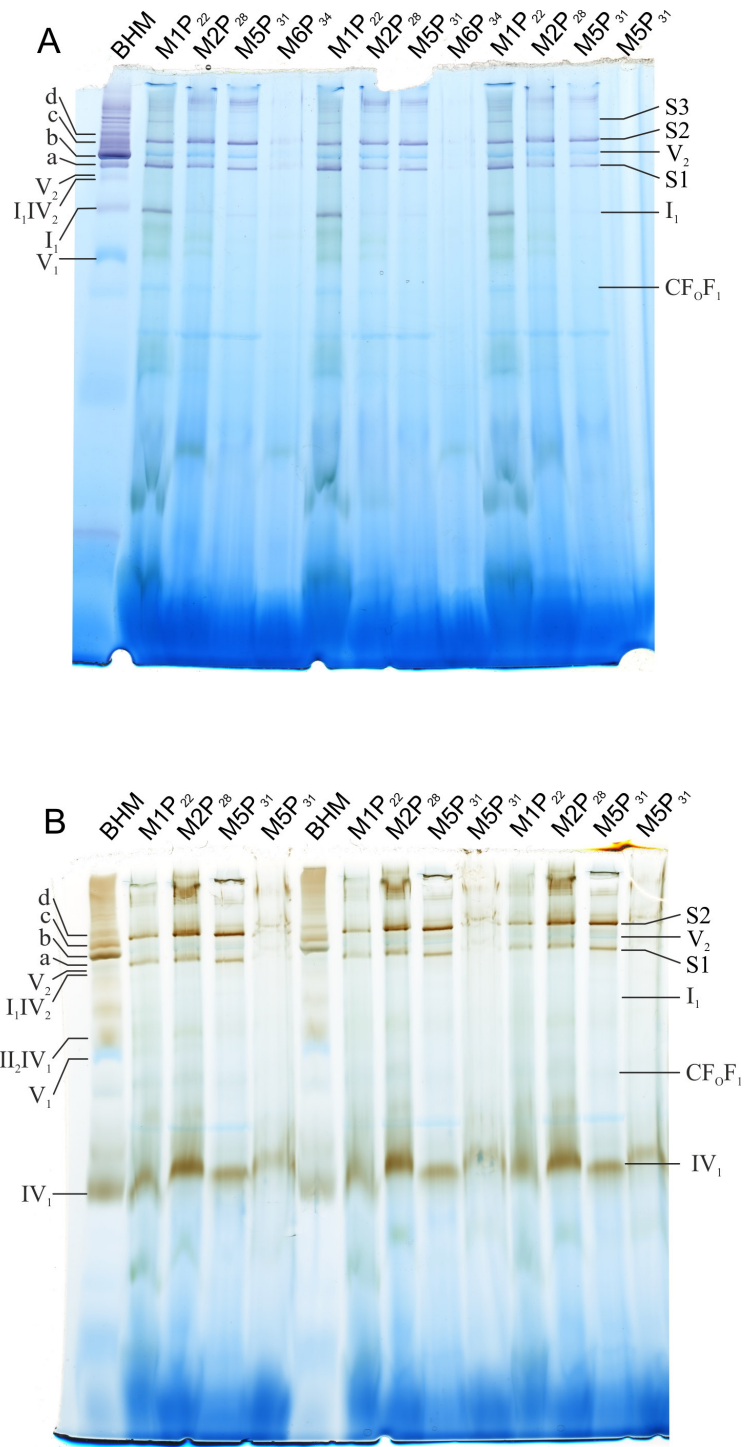


Abbildung 8.18: Proteinkomplexe von solubilisierten Mitochondrien aus *C. reinhardtii* bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen (22, 28, 31, 34 °C, photomixotroph) in einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (A) und für Komplex IV (B). Es wurden pro Spur jeweils 30 µg Protein (vor Solub., bezogen auf die Chlorophyll-Konzentration, Digitonin/Chlorophyll-Verhältnis von 40 g/g) von den mitochondrialen Präparationen (photomixotroph) bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen (M1P₂₂, M2P₂₈, M5P₃₁, M6P₃₄) auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Für die Aktivitätstests wurde BHM (100 µg vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 3 g/g) als Standard verwendet. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: S1 = I₁III₂IV₁, S2 = I₁III₂IV₂ bzw. für BHM a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.

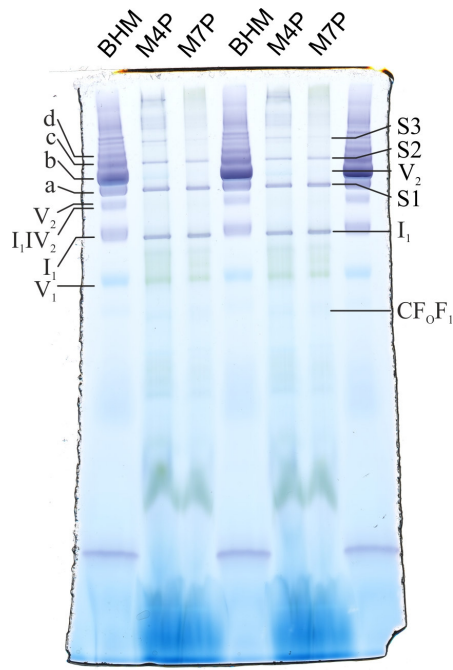


Abbildung 8.19: Proteinkomplexe von solubilisierten Mitochondrien aus *C. reinhardtii* bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen (22, 28 °C, photoautotroph) in einem In-Gel Aktivitätstest für Komplex I (B). Es wurden pro Spur jeweils 30 µg Protein (vor Solub., bezogen auf die Chlorophyll-Konzentration, Digitonin/Chlorophyll-Verhältnis von 40 g/g) von den mitochondrialen Präparationen (photoautotroph) bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen (M4P₂₂, M7P₂₈) auf ein großes BN-Gel (16 cm x 18 cm, T = 4 - 13 %, C = 3 %) gegeben. Für die Aktivitätstests wurde BHM (100 µg vor Solub., Digitonin/Protein-Verhältnis 3 g/g) als Standard verwendet. Die Superkomplexe sind wie folgt bezeichnet: S1 = I₁III₂IV₁, S2 = I₁III₂IV₂ bzw. für BHM a = I₁III₂, b = I₁III₂IV₁, c = I₁III₂IV₂, d = I₁III₂IV₃.





Sven-Hendric Marx

21. April 2016

Paul-Hindemith-Ring 16

63110 Rodgau

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Sven-Hendric Marx



Sven-Hendric Marx

21. April 2016

Paul-Hindemith-Ring 16

63110 Rodgau

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Sven-Hendric Marx



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sven-Hendric Marx
Adresse	Paul-Hindemith-Ring 16 63110 Rodgau
Geburtsdatum	17.05.1985
Geburtsort	Offenbach am Main
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Akademischer Werdegang

Feb. 2012 - Apr. 2016	Promotion im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Darmstadt, Physikalische Biochemie, Arbeitskreis von Prof. Dr. N. A. Dencher
März 2011 - Sept. 2011	Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Darmstadt, Titel der Arbeit: Isolierung, Charakterisierung und Quantifizierung von ATP-Synthase und anderen Membranproteinen
Okt. 2004 - Feb. 2011	Chemiestudium, Technische Universität Darmstadt

Schulausbildung

Aug. 2001 - Juni 2004	Oberstufe, Claus-von-Stauffenberg-Schule, Rodgau
Aug. 1995 - Juli 2001	Gymnasialer Zweig, Georg-Büchner-Schule, Rodgau
Aug. 1991 - Juli 1995	Grundschule, Carl-Orff-Schule, Rodgau

Rodgau, den 21. April 2016

Sven-Hendric Marx

